

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE
ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE



ANNALES

DE

LE MINISTRE NATIONAL

DE

RECHERCHE AGRICOLE

**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE



INFLUENCE DES PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD SUR LA FERMENTATION ALCOOOLIQUE ET LE DÉVELOPPEMENT DE LA LEVURE

N. M. SHEIKH, B. GODON et L. PETIT

*Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie
des Céréales et de leurs Dérivés. 16, rue Nicolas Fortin, Paris.*

PLAN DU MÉMOIRE

I. — INTRODUCTION.

- 1^o Généralités sur la réaction de Maillard.
- 2^o Plan du travail exposé.

II. — TECHNIQUES ET MÉTHODES ANALYTIQUES.

- 1^o Préparation des mélanoidines.
- 2^o Fermentations et cultures.
- 3^o Méthodes de dosages.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Première partie : Fermentations.

- 1^o Examen général de l'action de différentes mélanoidines.
 - A. — Mélanoidines de glucose et de glycolle.
 - B. — Mélanoidines de glucose et d'alpha-alanine.
 - C. — Mélanoidines de glucose et d'asparagine.
 - D. — Mélanoidines de glucose et de glutamate de sodium.
 - E. — Discussion.
- 2^o Étude particulière du dégagement de gaz carbonique.
 - 1^o Influence de la concentration sur l'activité des mélanoidines.
 - 2^o Influence du temps de fermentation.
 - 3^o Fractionnement des mélanoidines et localisation de l'activité.

Deuxième partie : Culture en aérobiose.

IV. — CONCLUSION GÉNÉRALE.

BIBLIOGRAPHIE.

I. — INTRODUCTION

1^o GÉNÉRALITÉS SUR LA RÉACTION DE MAILLARD :

Le nom de MAILLARD est resté attaché aux réactions entre sucres et aminoacides qu'il a décrites en 1912 (1) : lorsqu'on chauffe un mélange de sucres réducteurs et d'acides aminés en solution, on voit se développer une coloration brune qui va en s'intensifiant ; à un certain stade de la réaction, du gaz carbonique se dégage ; si le chauffage est poursuivi pendant un temps suffisant, on voit franchement précipiter un pigment noir, qui a reçu le nom de Mélanoidines.

Par la suite, il est apparu manifeste que les réactions entre sucres et protéines se rattachaient au même type de réaction, et, actuellement, le nom de « réaction de MAILLARD » est étendu en fait aux réactions glucides-protéides qui interviennent à l'état sec ou en solution, à température ambiante ou à chaud, et qui se manifestent par l'apparition d'un brunissement, sans intervention de processus enzymatique. Dans ces conditions, il apparaît donc que la réaction de MAILLARD est d'une très grande généralité, étant susceptible de se produire dans la plupart des milieux biologiques en les modifiant dans leur aspect, leur constitution et leurs propriétés chimiques et biologiques. Aussi a-t-elle fait l'objet de nombreux travaux, dont la plupart d'ailleurs ont trait à l'étude du mécanisme de la réaction, un nombre relativement très restreint se préoccupant des propriétés physiologiques des produits qui en dérivent.

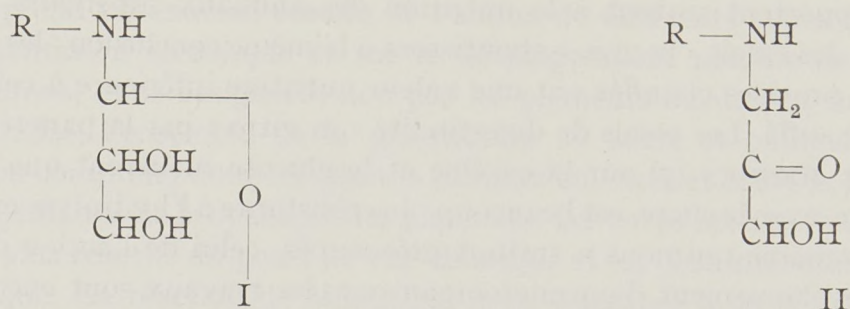
L'essentiel de nos connaissances sur la chimie de la réaction de MAILLARD se trouve rassemblé dans quelques revues bibliographiques : ENDERS (2), en 1938 ; DANEHY et PIGMAN (3), en 1951 ; HODGE (4), en 1953 enfin, ELLIS (5), en 1959.

Un certain nombre de travaux ont eu pour but de préciser les conditions de la réaction : nature des glucides et des protéides en présence, influence de leurs concentrations, du temps et de la température de chauffage ou des conditions physico-chimiques comme pH ou rH. Les caractères de la réaction ont également été précisés : outre le brunissement et le dégagement de gaz carbonique, la formation de mélanoidines s'accompagne d'une acidification, de l'apparition d'un pouvoir réducteur, d'une forte absorption dans l'ultra-violet et d'un développement de fluorescence.

D'autres études ont visé à élucider le déroulement de la réaction en identifiant les produits intermédiaires entre les molécules initiales et les pigments terminaux. Il apparaît que cette chaîne de réactions est certainement longue et compliquée : par chromatographie sur papier d'une préparation de mélanoidines obtenues par chauffage de glucose et de glycocolle marqués par C_{14} , CHICHESTER et ses collaborateurs (6) séparent plus de 24 composés différents, caractérisés par leur R_f , leur radioactivité éventuelle, leur réaction à la ninhydrine et à la paraphénylène-diamine ainsi que par leur fluorescence en lumière ultra-violette. Dans la revue bibliographique citée plus haut, HODGE propose de diviser en trois étapes principales cette réaction complexe :

1^o Dans un premier temps, molécule de sucre et molécule d'acide aminé se condensent avec élimination d'une molécule d'eau, les deux groupements réagissant étant la fonction aldéhydique d'une part, la fonction amine d'autre part. On obtient

ainsi une glycosylanine N-substituée (I) dont on a montré qu'elle s'isomérisait en 1-amino, 1-déoxy, 2-cétose (II) par réarrangement de AMADORI.



Les produits ainsi obtenus sont toujours incolores et dépourvus d'absorption ultra-violette.

2° Dans un deuxième stade, les molécules de sucre et d'amino-acides subissent des dégradations profondes. En particulier, la molécule de sucre est déshydratée ou coupée en chaînes carbonées plus courtes. C'est alors qu'apparaissent les dérivés furfuryliques, les réductones et les petites molécules comme l'acétol, le méthylglyoxal, le diacétyl, les aldéhydes glycolique et glycérique signalés par différents auteurs. De son côté, la molécule aminée, réagissant sur les composés dicarbonylés, subit entre autres la dégradation de STRECKER au cours de laquelle se dégage l'anhydride carbonique et prend naissance un aldéhyde possédant un carbone de moins que la molécule initiale d'acide aminé. Notre connaissance de cette étape de la réaction est très certainement incomplète et d'autres corps que ceux mentionnés ci-dessus s'y forment sûrement. Les composés formés à ce niveau sont caractérisés par une absorption ultra-violette due à la fois aux fonctions carbonylées et à la non-saturation des liaisons. Ils sont incolores ou très légèrement colorés dans le visible.

3° Enfin, dans une troisième phase, une suite de condensations entre groupements carbonylés ou entre groupes carbonylés et groupes aminés aboutit à la formation d'abord de composés fluorescents, puis, des pigments bruns, par des processus largement hypothétiques, sinon inconnus.

En fait, les phases de la réaction chevauchent les unes sur les autres, et à un moment donné — sauf tout au début lorsque les pigments ne sont pas encore apparus ou en fin de réaction — les différents constituants coexistent mais dans des proportions qui dépendront des conditions où s'effectue la réaction. Or, ces conditions peuvent varier dans de très larges limites de température, de pH, de concentrations — du milieu simplement humide à la solution diluée. Par suite, la composition d'un milieu où s'est développée la réaction de MAILLARD peut être très variable et une étude sur l'influence de cette réaction dans un certain domaine doit comprendre une série d'essais destinés à explorer l'influence de ces divers paramètres.

Parmi les domaines où cette réaction peut intervenir, celui de la nutrition des êtres vivants est sans aucun doute important. Lorsqu'il s'agit d'alimentation humaine, l'aspect et le goût des produits jouent un rôle important et là, d'assez nombreux travaux ont été effectués, concernant les altérations de ces propriétés par suite du brunissement et les moyens de les pallier. Mais, en dehors de cet aspect technologique de la question, on peut se demander quelles sont les répercussions physiologiques de cette réaction et chercher à savoir dans quelle mesure le métabolisme peut se trouver affecté, soit par la dégradation progressive des formes glucidiques et azotées, soit par

l'apparition des corps nouveaux, plus ou moins bien connus, formés au cours de la réaction. Les recherches n'ont été que fort peu poussées dans ce sens et les travaux effectués se rapportent surtout à la nutrition des animaux supérieurs. En général les conclusions des essais « in vivo » aboutissent à la même conclusion : les mélanges de glucides et de protides chauffés ont une valeur nutritive inférieure à celle du même mélange non chauffé. Les essais de digestibilité « in vitro » par la pancréatine menés par CREMER et MENDEN (7) sur la caséine et le glucose montrent que la protéine après chauffage avec le sucre, est beaucoup plus résistante à l'hydrolyse enzymatique.

Dans le domaine qui nous a surtout préoccupés, celui de l'action des mélanoidines sur le développement d'un microorganisme, les travaux sont encore plus restreints. En 1909, DZIERZBICKI (8), étudie l'action sur la fermentation et la croissance de la levure, non des mélanoidines, mais des substances humiques extraites du sol, composés ayant une composition globale et des propriétés physico-chimiques voisines de celles des mélanoidines proprement dites. Il constate que ces substances ont un effet favorable sur les phénomènes observés, particulièrement lorsque la levure est en petites quantités, le milieu de culture étant constitué de glucose, d'acide aspartique et de sels minéraux.

Si l'on s'intéresse à d'autres microorganismes que la levure, on trouve encore quelques références relatives à l'influence du chauffage des milieux de culture sur la croissance ; ces milieux de culture contenant en général des sucres et des aminoacides ou peptides, ces travaux peuvent ainsi donner quelques indications sur l'action éventuelle des mélanoidines dans ce domaine. PETERSON et ses collaborateurs (9) montrent que les produits de la réaction de MAILLARD peuvent inhiber légèrement et passagèrement la croissance de *B. polymyxa*. ZABRODSKI (10), étudiant l'action des mélanoidines sur la microflore des « mashs », trouve une inhibition du développement des moisissures et des bactéries, qu'il attribue à l'acidification du milieu. Enfin, CHELDELIN et KING (11), dans un travail sur la nutrition des microorganismes montrent que le N-glucosyl-glycine (N-G-G-) premier stade de la réaction glucose-glycocolle est capable d'activer la croissance de *L. Gayoni*. Lorsque le N-glucosylglycine est chauffé avec le milieu de culture, la courbe de réponse de la croissance en fonction de la concentration du N-G-G passe par un maximum, indiquant ainsi la possibilité d'une inhibition aux fortes concentrations. Lorsque le N-G-G n'est pas chauffé au préalable, la courbe de réponse se termine par un palier. L'inhibition est donc provoquée par un produit de réaction du N-G-G avec le milieu de culture. Il s'agit là des expériences les plus nettes mettant en évidence les possibilités d'action des mélanoidines sur la croissance d'un microorganisme.

2^o PLAN DU TRAVAIL EXPOSÉ :

Le présent travail se propose d'apporter une contribution à nos connaissances dans ce domaine dans le cas de la levure de boulangerie, *Saccharomyces Cerevisiae*. Ce microorganisme a été choisi pour différentes raisons : en premier lieu, il est appelé à se développer dans un milieu contenant normalement des mélanoidines, puisque les moûts industriels contiennent des mélasses de sucrerie. En outre, selon les conditions de culture — aérobie ou anaérobie — son métabolisme est orienté dans des sens très différents. Enfin, on sait que pour *Saccharomyces cerevisiae*, la forme sous laquelle l'azote est apporté présente une grande importance ; on pouvait donc espérer suivre

l'influence de la dégradation de l'azote au cours de la réaction de MAILLARD sur son assimilation.

Il comprend un examen étendu de l'action de différents types de mélanoidines sur la fermentation alcoolique et sur le développement aérobie de la levure. Par « mélanoidines », nous désignons, non pas les pigments insolubles, mais, suivant un usage généralisé, l'ensemble de la préparation où sucre et aminoacide ont réagi. Un tel milieu comprend donc les réactifs initiaux en excès et toute la gamme des produits intermédiaires de la synthèse des pigments. Ces corps intermédiaires sont certainement les plus réactifs du point de vue chimique et les plus intéressants du point de vue biologique. La réaction de MAILLARD a été effectuée à 90 °C, généralement en milieu 1 M en chacun des constituants initiaux ; quelques préparations ont cependant été effectuées en milieu plus concentré ou plus dilué. Les temps de chauffage ont été compris entre quelques heures et soixante heures, selon la réactivité des constituants mis en jeu. On a laissé le pH du milieu évoluer librement ; il s'est donc déplacé vers les valeurs acides au cours du déroulement de la réaction.

Nous n'avons étudié que les mélanoidines dérivées du glucose. Avec ce sucre, on a fait réagir 4 aminoacides, choisis en raison de leurs efficacités sensiblement différentes du point de vue source azotée. Avec le matériel préparé dans ces conditions, le travail suivant a été effectué :

a) *En anaérobiose*

1° Les mélanoidines ont été ajoutées à un milieu de culture complètement dépourvu de toute source azotée mais possédant par contre tous les autres éléments minéraux et organiques nécessaires à la levure. Ces essais ont été réalisés dans un fermentomètre construit au laboratoire. On a mesuré :

a — La vitesse de dégagement de l'anhydride carbonique et la quantité totale libérée.

b — Le poids de levure produit.

c — La quantité et la forme (aminée ou mélanoidine) de l'azote consommé.

d — La quantité et la nature des alcools formés.

e — La quantité globale d'acidité apparue.

f — La production de différents produits secondaires de la fermentation : glycérol, 2-3 butanediol et acétoïne.

g — L'évolution du diacétyle et de l'acétone préexistant en général dans les mélanoidines.

2° Une action nette sur la cinétique du dégagement de CO₂ ayant été observée au cours de ces essais systématiques, nous nous sommes efforcés de préciser la nature et l'origine de ces phénomènes. Ce travail a été effectué à partir d'une mélanoidine de glucose et de glycocolle ; cette préparation a été fractionnée par différentes techniques et on a tenté un début d'isolement des substances responsables de l'effet observé. Comme il s'agit là d'un effet cinétique, il a été possible d'utiliser la technique, plus précise, du micro-Warburg.

b) *En aérobiose*

Les mêmes mélanoidines ont été utilisées dans des essais en aérobiose destinés à mettre en évidence leur action sur la multiplication cellulaire. Le principe expéri-

mental est le même que celui suivi en fermentation : on compare, toutes choses égales d'ailleurs, la croissance de la levure dans des milieux contenant, d'une part, tous les éléments nécessaires à son développement sauf une source azotée, d'autre part, la mélanoidine étudiée ou l'acide aminé utilisé pour sa préparation.

II. — TECHNIQUES ET MÉTHODES ANALYTIQUES

1° PRÉPARATION DES MÉLANOÏDINES :

Les mélanoidines ont été généralement préparées à partir de solutions de glucose et de solutions d'acides aminés en utilisant des volumes égaux de chaque solution de molarité 2 M. 10 cc de chaque solution sont introduits dans un tube rodé et le mélange est chauffé à reflux à 90° pendant le temps nécessaire. Après refroidissement, la préparation de mélanoidine est ajustée à un volume de 50 cc et conservée au froid.

2° FERMENTATIONS ET CULTURES :

a) *Levure*

La suspension de levure utilisée pour effectuer les ensemencements a été préparée à partir d'une culture de *Saccharomyces Cerevisiae*, isolée d'un pain de levure commerciale et entretenue sur milieu solide.

La levure recueillie a été lavée à l'eau distillée et mise en suspension dans un volume tel que les 10 cc employés apportent environ 160 mg de levure sèche.

b) *Milieux de base*

Après avoir essayé des milieux de compositions diverses, nous avons finalement retenu le milieu de base préconisé par l'Association of Official Agricultural Chemists pour le dosage de la thiamine, par la méthode de fermentation, à cette modification, près que les sels d'ammonium ont été remplacés par des sels de potassium et que l'hydrolysate de caséine a été omis, la seule source d'azote devant être apportée par la préparation de mélanoidines. On prépare donc les solutions de compositions suivantes:

— Solution A :

PO ₄ HK ₂	95 g
PO ₄ H ₂ K.....	213 g
Vitamine PP.....	200 mg
Vitamine B6.....	4 mg

On amène à 1 000 cc

— Solution B :

Glucose anhydre.....	200 g
SO ₄ Mg 7H ₂ O.....	7
PO ₄ H ₂ K.....	2,2
K Cl.....	1,7
Ca Cl ₂ 2H ₂ O.....	0,5
Fe Cl ₃ 6H ₂ O.....	0,01
Mn SO ₄ 4H ₂ O.....	0,01

On amène le volume à 1 000 cc. Les deux solutions sont autoclavées.

— Solution de thiamine : à 0,2 γ/cc.

c) *Appareils et modes opératoires*

a) *Fermentation.*

Le vase à fermentation est un ballon de 250 cc à fond rond et col long, muni d'un diverticule d'environ 25 cc greffé sur le col. Ce récipient, plongé dans un thermostat, est relié à un manomètre à eau, à niveau variable, où sera recueilli le gaz carbonique dégagé et son volume lu à la pression atmosphérique et à température constante. La capacité maximum de ce manomètre est de 450 cc.

Le milieu de fermentation est réalisé par le mélange des solutions décrites ci-dessus qui donne et maintient un pH de 6,00.

Solution A	2,5 cc.
Solution B	7,5 cc.
Solution de Thiamine.....	10 cc.

auquel on ajoute :

— soit la mélanoidine étudiée (5 cc) et un volume convenable (v cc) de solution 0,4 M de glucose, tel que l'ensemble apporte 2 millimolécules de glucose,

— soit 5 cc d'un mélange de glucose et d'acide aminé 0,4 M en chaque composant, pour réaliser l'essai témoin.

Chaque solution est introduite dans le ballon à fermentation ; on ajoute (15-v) cc d'eau et on dépose 10 cc de la suspension de levure dans le diverticule. Après un séjour de 1 heure dans le thermostat à 30° C, le ballon est relié au manomètre, et, par renversement du ballon, on mélange levure et milieu de culture. A partir de ce moment, pris comme origine des temps, on relève de 15 minutes en 15 minutes, les quantités de gaz carbonique dégagé, le ballon étant agité mécaniquement. Les volumes recueillis sont connus avec une précision de ± 3 p. 100 environ. La quantité de levure et de glucose mis en jeu est telle que la fermentation est complète en 24 heures, le volume total de CO₂ étant alors de 400 cc.

Cet appareil et ce mode opératoire ont été utilisés au cours de l'examen systématique des différentes mélanoidines, de façon à obtenir des quantités suffisantes de jus complètement fermentés. Pour l'étude des activateurs et inhibiteurs de fermentation, on a employé la technique classique, plus précise et plus rapide, du micro-Warburg.

b) *Cultures en aérobiose.*

L'appareil utilisé est un flacon conique de 1 litre portant une plaque de verre fritté au sommet du cône qui constitue la base du récipient, contenant 100 cc de milieu de culture. A travers cette plaque poreuse, on insuffle de l'air sous pression, préalablement humidifié et filtré. Le débit d'air par minute est à peu près égal à 2 fois le volume de milieu de culture.

Celui-ci a la même composition que celui utilisé en fermentation. Toutefois, la solution B ne contenait pas de glucose : celui-ci a été ajouté séparément et en quantité telle que la somme du glucose apporté par la mélanoidine et de ce glucose ajouté soit constante.

Les 2 cc de suspension de levure utilisés pour l'ensemencement apportent 10 mg de substance sèche.

La quantité de levure formée a été mesurée par turbidimétrie à 550 m μ d'une dilution convenable en milieu alcalin effectué sur une prise d'échantillon, après centrifugation et lavage à fond.

3° MÉTHODES DE DOSAGES :

Les mélanoidines étudiées et les milieux fermentés ont été analysés de façon à préciser leur constitution en composés les plus importants ou les plus significatifs.

Glucose.

De nombreux composés réducteurs étant formés au cours de la réaction de MAILLARD, il est préférable de séparer le glucose avant de le doser. Nous avons utilisé dans ce but l'action d'un échangeur de cations Dowex (D 50 $\times$ 8 50-100). 2 cc de la solution de mélanoidine sont versés sur une colonne de 50 cm de hauteur et 16 mm de diamètre remplie par cette résine mise sous forme acide. On rince à l'eau distillée et on recueille l'effluent par fraction de 5 cc jusqu'à passage d'un volume total de 80 cc, l'opération s'effectuant à la vitesse de 1 cc en deux minutes environ. On localise la position du glucose dans l'effluent par la réaction au phthalate acide d'aniline effectuée sur des gouttes de 20 μ l déposées sur papier ; en général, le glucose passe entre 35 et 60 cc. On recueille ces fractions, complète leur volume à 50 cc et dose le glucose par la méthode de SHAFFER-HARTMANN (12), avec une précision de $\pm 1,5$ p. 100.

Après fermentation jusqu'à cessation du dégagement de gaz carbonique, la réaction au phthalate d'aniline sur les jus fermentés est négative et donc le glucose n'a pas été dosé.

Azote.

1° *Azote total* : Il a été dosé par micro-Kjeldahl, après attaque sulfurique en présence de catalyseur au cuivre. On distille dans l'acide chlorhydrique 0,05 N et on titre en retour par une soude de même normalité. La quantité totale d'azote restant constante au cours de la formation des mélanoidines, ce dosage n'a été pratiqué que sur les milieux après fermentation.

2° *Azote aminé* : La méthode la moins inexacte d'évaluation de l'acide aminé dans les mélanoidines consiste en un dosage après chromatographie sur papier. Celle-ci a été effectuée sur des prises d'échantillons de 10 μ l, apportant au maximum 15 γ d'acide aminé, avec un solvant monophasique composé de N-butanol, de pyridine et d'eau, dans les proportions de 15/50/20, en volumes. Au moins dans le cas d'une mélanoidine de glucose et de glycocolle, ce solvant permet de séparer du glycocolle le N-glycoside qui réagit aussi à la ninhydrine et peut donc perturber le dosage. Après évaporation du solvant, on dose à la ninhydrine selon la méthode de THOMPSON (13) comportant la révélation en atmosphère de gaz carbonique et d'alcool. Après élution des taches colorées dans l'alcool à 50 p. 100, on mesure les densités optiques à 570 m μ . On trace une courbe étalon avec des solutions de titre connu en acide aminé, chromatographiées et traitées de façon identique. La précision globale est de l'ordre de ± 8 p. 100.

3° *Azote dégradé* : ou azote des mélanoidines (N_M) : Nous appelons ainsi l'ensemble des formes azotées autres que l'acide aminé initial. Si N_T est la concentration moléculaire en azote total, soit calculé, dans le cas d'une mélanoidine, soit dosé, dans le cas d'un milieu de culture, et N_A la concentration en azote aminé dosé par la méthode précédente, on a par définition :

$$N_M = N_T - N_A$$

Étant donné l'imprécision de N_A et du fait que, fort peu d'acide aminé étant détruit au cours de la réaction de MAILLARD, $N_T - N_A$ est en général faible, N_M n'est connu qu'avec une mauvaise approximation et seules des variations importantes ou systématiques pourront être prises en considération.

Alcools.

Les alcools sont fractionnés, selon la méthode de NEISH, (14) sur une colonne de célite 535 dont le développement est assuré par trois lavages successifs : tétrachlorure de carbone, mélange tétrachlorure-chloroforme, enfin chloroforme. On sépare ainsi et dans l'ordre :

N-butanol
isopropanol
éthanol.

Dans ces trois effluents, on dose l'alcool par oxydation sulfochromique, l'excès de réactif étant titré par iodométrie. L'erreur globale avoisine ± 6 p. 100.

Acides.

Les seuls acides dosés ont été les acides extractibles à l'éther. Sont donc compris dans ce dosage tous les acides provenant de la fermentation — les seuls intéressant ce travail — mais non tous les acides formés au cours de la réaction de MAILLARD.

Une prise d'essai contenant, dans un volume inférieur à 5 cc, de 0,5 à 1 milliéquivalent acide est extraite par l'éther dans un microextracteur pendant 24 heures, au bain marie à 60 °C et à une vitesse de 2 à 3 cc par minute. L'acidité est titrée par la soude 0,1 N en présence de rouge de phénol. La précision est de l'ordre de ± 2 p. 100.

Glycérol.

Certains auteurs ayant signalé la possibilité de formation de glycérol au cours de la réaction de MAILLARD, ce composé a été recherché dans nos préparations de mélanoidines. Pour ce faire, les mélanoidines ont été fractionnées par chromatographie sur papier avec le butanol saturé d'eau : on sépare ainsi glucose et glycérol. Les chromatogrammes ont été traités au métaperiodate de sodium, puis à l'acétate de benzidine. Aucune trace de glycérol n'a été mise en évidence.

Dans les solutions fermentées, le glycérol a été dosé par la méthode de NEISH : le formaldéhyde obtenu par oxydation périodique du glycérol donne avec l'acide chromotrope une réaction colorée dont l'intensité est mesurée à 570 m μ . L'excès d'acide périodique est au préalable détruit par action de l'arsénite de sodium. La reproductibilité des mesures est de l'ordre de ± 4 p. 100. On dose de 10 à 50 γ .

2-3 Butanediol.

Ce composé a lui aussi été dosé par l'intermédiaire de l'oxydation périodique au cours de laquelle se forme de l'acétaldéhyde. Cet aldéhyde réagit avec le nitroprussiate de sodium, en milieu rendu alcalin par addition de pipérazine, pour donner une coloration bleue. La coloration se développe progressivement, puis s'affaiblit. On suit son évolution à 570 m μ et on note le maximum atteint. La précision obtenue est de l'ordre de ± 4 p. 100 et la quantité dosée, de 400 γ maximum.

Acétoïne.

La méthode de WESTERFIELD (15) qui a été utilisée a pour base la réaction colorée obtenue lorsque l'on fait agir sur l'acétoïne un mélange de créatine et d'alpha-naphtol ; l'intensité de la coloration rouge obtenue est mesurée à 530 m μ . On dose ainsi un maximum de 15 γ avec une précision de ± 3 p. 100.

Diacétyl.

Le diacétyl a été dosé dans les mélanoidines et dans le milieu fermenté par la méthode de WHITE (16) qui consiste à former la diméthylglyoxime, par action de l'hydroxylamine, et à faire réagir celle-ci avec l'urée en milieu acide fort. Dans ces conditions, on obtient une coloration jaune, dont l'intensité est lue à 475 m μ . On peut doser jusqu'à 60 γ , avec une erreur de ± 2 p. 100.

Acétone.

La possibilité d'une formation d'acétone au cours de la réaction de MAILLARD ayant été signalée par certains auteurs, il était intéressant de doser ce composé et de suivre son évolution éventuelle au cours de la fermentation. Nous avons appliqué la réaction classique au salicylaldéhyde en milieu alcalin. La coloration rouge obtenue avec un maximum de 40 γ dans la prise, est mesurée à 530 m μ . La reproductibilité des mesures est de $\pm 1,5$ p. 100. En fait, l'exactitude du dosage est inférieure à cette valeur : on a constaté que le glucose était susceptible d'interférer.

Dans toutes ces différentes mesures colorimétriques, les corrections ont été faites relatives à l'absorption des réactifs et à l'absorption propre des mélanoidines.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

PREMIÈRE PARTIE

FERMENTATIONS

1. EXAMEN GÉNÉRAL DE L'ACTION DE DIFFÉRENTES MÉLANOIDINES

Nous présentons ici l'ensemble des résultats analytiques obtenus lorsqu'au milieu de base de fermentation décrit plus haut, on ajoute une même quantité de diverses préparations de mélanoidines. Celles-ci diffèrent entre elles, d'abord par la nature de l'acide aminé dont elles dérivent, ensuite, à l'intérieur de chacune de ces catégories, par l'intensité à laquelle la réaction a été poussée ; toutes choses égales d'ailleurs, cette intensité de réaction est proportionnelle au temps de chauffage. Dans l'impossibilité où nous nous trouvons de définir de façon précise et simple la composition d'une préparation de mélanoidines, c'est ce temps de chauffage — à 90 °C, dans tous les essais — qui est pris comme point de repère.

Pour chaque mélanoidine, nous indiquerons d'abord les quantités de glucose et d'acide aminé en excès à la fin de la réaction ; d'une part, ces grandeurs sont utiles à

la conduite des essais et au calcul des résultats ; d'autre part, elles permettent de préciser cette notion d'intensité de la réaction.

Ensuite, nous dressons les tableaux des résultats obtenus à partir de milieux de fermentation ; seul le dégagement de gaz carbonique a été observé pendant le développement de la fermentation ; les autres données sont relatives à des milieux complètement fermentés.

Nous avons étudié ainsi les mélanoidines dérivées du glycolle, de l'alpha-alanine, de l'asparagine et du glutamate de sodium. Dans ce dernier cas, nous avons utilisé la forme du sel monosodique de façon à éviter la dégradation acide du glucose qui aurait entraîné la formation de grandes quantités de 5-hydroxymethylfurfural ; alors l'agent essentiel de la suite des réactions aurait été non le glucose mais ce 5 HMF extrêmement réactif vis-à-vis des groupes aminés et apte au brunissement spontané.

A — MÉLANOÏDINES DE GLUCOSE ET DE GLYCOLLE

1° Composition des mélanoidines :

TABLEAU I

(résultats exprimés en millimolécules par cc de solution utilisée pour les essais de fermentation).

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Glucose.	0,4	0,33	0,29	0,28	0,24	0,21	0,17	0,16
N _A ⁰	0,4	0,34	0,31	0,30	0,29	0,26	0,25	0,22
N _M ⁰	0	0,06	0,09	0,10	0,11	0,14	0,15	0,18

(N_A⁰ = azote aminé ; N_M⁰ = azote dégradé = 0,4 — N_A⁰).

2° Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps
(résultats exprimés en cc)

TABLEAU 2

Temps de fermentation	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
8 heures.	213	206	230	234	244	238	220	214
9 —	239	232	258	260	270	265	246	240
0 —	265	258	276	284	300	295	276	268
1 —	292	284	304	308	327	327	306	296
22 —	316	308	340	350	355	355	338	322
23 —	339	332	362	372	380	381	360	348
24 —	360	354	382	386	386	381	384	368
25 —	377	372	382	386	386	381	386	376
26 —	381	382	382	386	386	381	386	382

On constate que, sauf dans le cas de la mélanoidine de 8 heures, le dégagement de gaz carbonique se trouve accéléré par rapport au témoin, le volume total recueilli étant invariable.

b) *Levure formée*

TABLEAU 3

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h .
Poids récolté en mg ..	237	254	251	258	258	260	260	260
Accroissement p. 100..	48	59	57	61	61	62,5	62,5	62,5

$$\text{Accroissement p. 100} = \frac{(\text{poids récolté (en mg)} - 160) \times 100}{160}$$

Quelle que soit la mélanoidine, le développement cellulaire est nettement amélioré par rapport au témoin.

c) *Évolution des trois formes d'azote*

TABLEAU 4

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
N_T N_T^O	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
N_T N_T^R	0,33	0,31	0,29	0,33	0,34	0,31	0,33	0,32
ΔN_T	0,07	0,09	0,11	0,07	0,06	0,09	0,08	0,08
N_A N_A^O	0,4	0,34	0,31	0,30	0,29	0,26	0,26	0,22
N_A N_A^R	0,33	0,29	0,26	0,25	0,22	0,20	0,16	0,14
ΔN_A	0,07	0,05	0,05	0,05	0,07	0,06	0,09	0,08
N_M N_M^O	0	0,06	0,09	0,10	0,11	0,14	0,15	0,18
N_M N_M^R	0	0,02	0,03	0,08	0,12	0,11	0,17	0,18
ΔN_M	0	0,04	0,06	0,02	-0,01	0,03	-0,01	0

total (N_T), aminé (N_A) et dégradé ($N_M = N_T - N_A$). Tableau 4.

Nous rappelons dans ce tableau les valeurs N_T^O , N_A^O et N_M^O dosées ou calculées pour les mélanoidines.

Par différence entre ces valeurs et les quantités résiduelles obtenues après fermentation, on a les quantités ΔN_T , ΔN_A et ΔN_M , disparues au cours de la fermentation. (Les résultats sont exprimés en millimolécules par cc de mélanoidine initiale).

Il ressort de ce tableau que la consommation d'azote est faible : au maximum 20 p. 100 de l'azote présent. La consommation d'azote aminé est pratiquement constante, quelle que soit la mélanoidine utilisée. Pour les mélanoidines de 16 heures et plus, cette forme d'azote est pratiquement la seule utilisée par la levure.

Par contre, lorsque la réaction de MAILLARD est peu poussée, il semble qu'une

partie de l'azote dégradé puisse être assimilé ; la forme de cet azote est vraisemblablement assez proche de la forme aminée primitive.

d) *Alcools, exprimés en micromôles par cc de solution fermentée.*

TABLEAU 5

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Ethanol	167	160	157	166	163	163	166	163
Propanols	10	2,6	2,3	4,8	4,8	4,8	10	10
Butanols	0	0	0	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5

Il ne semble pas que la présence de mélanoidine affecte sensiblement la production totale d'alcool éthylique ; peut-être peut-on noter une légère dépression en présence de mélanoidines de 8 à 12 heures. Cette variation est à peine significative, la précision de la méthode étant de l'ordre de 6 p. 100. Il ne paraît pas non plus que l'on puisse attacher une importance quantitative aux teneurs en propanols et butanol.

e) *Acides, exprimés en microéquivalents-acides par cc de la solution fermentée.*

TABLEAU 6

Acide	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Résiduels	16,2	13	13	13	15	13	13	10
Préformés	0	3	3	3	3	4	4	5
Différence	16,2	10	10	10	12	9	9	5

La décroissance observée ici est certainement significative en raison de la bonne précision du dosage et aussi en raison de sa continuité. On ne peut exclure que la correction apportée en soustrayant l'acidité initiale de la mélanoidine soit un peu forte, une partie au moins de ces acides pouvant être consommée par la levure. Mais cela ne change pas le sens du phénomène.

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne*

TABLEAU 7

(en micromôles par cc de solution fermentée).

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Glycérol	2,2	2,99	2,8	2,4	2,9	2,1	3,1	2,9
2-3 Butanediol	0,7	0,8	1	0,9	0,8	0,8	0,5	0,4
Acétoïne	0,01	0,04	0,045	0,05	0,05	0,04	0,03	0,03

La production de glycérol est toujours un peu plus élevée en présence de mélanoidines; celle du 2-3 butanediol augmente, passe par un maximum et tombe enfin à une valeur inférieure à celle du témoin. L'amplitude de ces deux variations est de toutes façons faible. L'acétoïne dosée est pratiquement nulle; si donc la production de petites quantités de 2-3 butanediol s'effectue par réduction d'acétoïne cette réduction est totale.

g) *Diacétyl et acétone.*

TABLEAU 8

Ces deux composés préexistent dans les mélanoidines introduites dans le milieu; ils ne sont pas normalement produits par la levure en fermentation. Il était intéressant de voir dans quelle mesure elle était capable de les utiliser lorsqu'ils se trouvaient mis à sa disposition.

	Mélanoidine de :						
	8	12	16	24	36	48	60 h.
Diacétyl préformé	0,06	0,09	0,13	0,18	0,20	0,29	0,35
Diacétyl après fermentation ...	0,06	0,09	0,13	0,18	0,20	0,29	0,35
Différence.....	0	0	0	0	0	0	0
Acétone préformée	0,07	0,07	0,07	0,11	0,19	0,19	0,23
Acétone après fermentation	0,05	0,08	0,11	0,14	0,20	0,23	2,25
Différence	— 0,02	0,01	0,04	0,03	0,01	0,04	0,02

Aucun des deux composés n'est utilisé par la levure. Il ne semble pas qu'il faille attacher une signification aux valeurs positives trouvées pour l'acétone; les écarts trouvés, bien que systématiquement positifs, sont de l'ordre des erreurs d'expérience dans un dosage qui, par ailleurs, n'est pas absolument spécifique.

En résumé, avec ce type de mélanoidines :

- 1° on note une nette accélération du dégagement de gaz carbonique;
- 2° on relève un accroissement sensible du poids de levure récoltée;
- 3° il semble que certaines formes peu dégradées de l'acide aminé soient susceptibles d'être utilisées par la levure;
- 4° on observe quelques légères déviations du métabolisme normal.

B — MÉLANOIDINES DE GLUCOSE ET D'ALPHA-ALANINE

L'alpha-alanine réagit intensément avec le glucose; aussi pour un temps de chauffage de 36 h et plus, la réaction est assez poussée pour que se forment les mélanoidines insolubles. Ces précipités ont été éliminés par filtration.

1° *Composition des mélanoidines*

TABLEAU 9

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Glucose	0,40	0,36	0,35	0,33	0,29	0,27	0,25
N _A ^o	0,40	0,32	0,31	0,29	0,27	0,25	0,23
N _M ^o	0	0,08	0,09	0,11	0,13	0,15	0,17

2° Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

TABLEAU IO

Temps de fermentation	Mélanoidine de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
1 heure	24	22	21	20	27	24	24
2 heures.....	49	44	42	43	52	48	47
3 —	72	66	66	66	77	73	71
4 —	303	284	284	288	309	294	279
23 —	341	322	324	328	348	335	318
24 —	376	357	362	364	385	374	356
25 —	404	398	404	403	407	409	402
26 —	404	398	404	403	407	409	402

Seule la préparation de 36 heures a tendance à accélérer la fermentation ; les autres tendant plutôt à diminuer la vitesse de dégagement de CO₂.

b) Poids de levure formée.

TABLEAU II

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Poids récolté en mg	261	266	264	265	249	249	250
Accroissement p. 100	63	66	65	65,5	55	55	55

Jusqu'à 36 heures de préparation, on ne remarque aucune influence sur le poids de levure formée ; au-delà de 36 heures, net effet dépressif.

c) Évolution des 3 formes d'azote.

TABLEAU I2

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
N _T N _T ^O	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
N _T N _T ^R	0,23	0,27	0,27	0,25	0,26	0,27	0,26
Δ N _T	0,17	0,13	0,13	0,15	0,14	0,13	0,14
N _A N _A ^O	0,40	0,31	0,30	0,29	0,27	0,25	0,23
N _A N _A ^R	0,23	0,24	0,21	0,19	0,15	0,16	0,13
Δ N _A	0,17	0,07	0,09	0,10	0,12	0,09	0,10
N _M N _M ^O	0	0,11	0,10	0,06	0,12	0,16	0,18
N _M N _M	0	0,03	0,06	0,06	0,11	0,11	0,12
Δ N _M	0	0,08	0,04	0	0,01	0,05	0,06

L'assimilation de l'azote total et de l'azote aminé est à peu près constante, quelle que soit la durée de chauffage subi par l'acide aminé. L'azote aminé paraît moins bien assimilé en présence de mélanoidines qu'il ne l'est chez le témoin. L'azote dégradé est, de façon générale, mal utilisé par la levure.

d) *Alcools.*

TABLEAU 13

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Ethanol.....	150	155	148	149	150	150	150
Propanols.....	22,5	27,5	30	27,5	17,5	17,5	15
Butanols.....	0	0	0	0	0	0	0

La production d'éthanol est pratiquement inchangée ; celle de propanol est légèrement augmentée par les premières préparations et diminuée au-delà de 36 heures de chauffage.

e) *Acides.*

TABLEAU 14

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Acides.							
Résiduels.....	14,5	15,9	15	12	13	12	11
Préformés.....	0	4	6	6	6	7	7
Différence.....	14,5	11,9	9	6	7	5	4

La quantité d'acides accumulée dans le milieu décroît très notablement, en proportion du temps de chauffage de la mélanoidine.

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne.*

TABLEAU 15

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Glycérol.....	3,4	6	5,3	5	5	5	4,9
2-3 Butanediol.....	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,7	1,7
Acétoïne.....	0,04	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03

La production de glycérol est augmentée dans tous les cas ; celle de 2-3 butanediol également, mais dans de moindres proportions ; quant à l'acétoïne, la quantité dosée est très faible et sensiblement constante.

g) *Diacétyle et Acétone.*

TABEAU 16

	Mélanoidines de :					
	8	16	24	36 h.	48	60 h.
Diacétyle						
Préformé	0,05	0,13	0,20	0,23	0,28	0,26
Résiduel	0,08	0,19	0,23	0,33	0,38	0,37
Différence	0,03	0,06	0,03	0,10	0,10	0,11
Acétone						
Préformée	0,02	0,04	0,05	0,09	0,13	0,12
Résiduelle	0,08	0,10	0,13	0,16	0,17	0,17
Différence	0,06	0,06	0,12	0,07	0,04	0,05

Résumé.

Ces mélanoidines, dérivées de l'alpha-alanine ont un effet plutôt défavorable en ce qui concerne la vitesse de fermentation et le poids de levure récoltée. En ce qui concerne l'assimilation de l'azote, leur influence a tendance à être là aussi défavorable.

La production d'alcool éthylique subit des variations non significatives ; celles des produits secondaires ne montrent que des variations de faibles amplitudes.

C — MÉLANOÏDINES DE GLUCOSE ET D'ASPARAGINE

L'asparagine étant trop peu soluble pour que l'on puisse en préparer des solutions 2 M, on a pesé la quantité correspondante à 10 millimolécules et on lui a ajouté 10 cc d'une solution 1 M de glucose. Les concentrations ne sont donc pas exactement moléculaires elles sont du moins initialement identiques pour toutes les préparations.

1° Composition

TABEAU 17

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h
Glucose	0,40	0,39	0,37	0,35	0,28	0,24
N _A ⁰	0,40	0,24	0,20	0,16	0,14	0,14
N _M ⁰ + Ad	0	0,16	0,20	0,24	0,26	0,26

En raison de la présence de la fonction amide, il n'a pas été possible de calculer de la même façon que précédemment l'azote des mélanoidines ; c'est l'ensemble « Azote des mélanoidines + Azote amidé » (N_{M + Ad}) qui figure dans ce tableau.

2° Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

TABLEAU 18

Temps de fermentation	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
1 heure	20	22	21	23	24	25
2 heures	46	49	47	53	53	54
4 heures	122	125	130	140	144	147
6 heures	234	238	254	274	279	285
21 heures	356	356	366	376	388	386
22 heures	390	390	392	398	398	396
23 heures	390	390	392	398	398	396

Dès les premières heures de la fermentation, on observe un accroissement important de la vitesse de fermentation, d'autant plus marqué que le temps de préparation est plus long.

b) Levure formée.

TABLEAU 19

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Poids récolté en mg. .	353	359	350	355	336	336
Accroissement p. 100.	121	124	118	122	110	110

Légère influence dépressive des mélanoidines de longue durée de préparation.

c) Évolution des trois formes d'azote.

TABLEAU 20

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
N_T N_T^O	0,80	0,64	0,64	0,62	0,66	0,64
N_T N_T^R	0,46	0,34	0,36	0,34	0,36	0,46
ΔN_T	0,34	0,30	0,28	0,28	0,30	0,28
N_A N_A^O	0,40	0,24	0,20	0,16	0,14	0,14
N_A N_A^R	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,07
ΔN_A	0,17	0,12	0,11	0,09	0,07	0,07
N_{M+A_d} $N_{M+A_d}^O$	0,40	0,40	0,44	0,46	0,52	0,50
N_{M+A_d} $N_{M+A_d}^R$	0,23	0,22	0,27	0,27	0,30	0,29
ΔN_{M+A_d}	0,17	0,18	0,17	0,19	0,22	0,21

Alors que l'azote total consommé ou la somme $N_M + N_{A_d}$ reste à peu près constante, la quantité d'azote aminé utilisé en cours de fermentation diminue sensiblement avec le temps de réaction.

d) *Alcools.*

TABLEAU 21

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Éthanol	196	178	173	168	159	154
Propanols.....	0	0	0	0	0	0
Butanols.....	12	7,2	8	8,4	14,4	11

La production d'éthanol est nettement affectée par la présence des mélanoidines.

e) *Acides.*

TABLEAU 22

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Résiduels	7	6	9	8	7	7
Préformés.....	0	5	5	5	6	6
Différence.....	7	1	4	3	1	1

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne.*

TABLEAU 23

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Glycérol	11,2	8,7	10,8	12,3	12,8	11
2-3 B ^o 1	0,5	0,7	0,6	0,8	0,8	0,9
Acétoïne	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02

g) *Diacétyle, Acétone.*

TABLEAU 24

		Mélanoidines de				
		8	16	24	36	48 h.
Diacétyle	Préformé	0,05	0,20	0,27	0,41	0,50
	Résiduel	0,05	0,20	0,27	0,41	0,50
	Différence	0	0	0	0	0
Acétone	Préformée	0,11	0,14	0,17	0,21	0,24
	Résiduelle	0,07	0,09	0,16	0,20	0,24
	Différence	— 0,04	— 0,05	— 0,01	— 0,01	0

Résumé.

On note là aussi un effet accélérateur très net sur le dégagement gazeux. Par contre, la quantité d'éthanol formée est sensiblement diminuée, de même que le poids de levure récolté.

Aucune influence n'est observable sur les produits secondaires de la fermentation : glycérol, 2-3 Butanediol et Acétoïne, sauf peut être une légère augmentation de la quantité de 2-3 butanediol.

D — MÉLANOÏDINES DE GLUCOSE ET GLUTAMATE DE SODIUM

Ces mélanoïdines ont été préparées selon la technique habituelle, par mélange à volumes égaux de solutions 2 M.

1^o Composition

TABLEAU 25

	Mélanoïdines de			
	0	8	24	48 h.
Glucose	0,40	0,33	0,24	0,21
N _A ^o	0,40	0,14	0,11	0,07
N _M ^o	0	0,26	0,29	0,33

En raison de l'alcalinité initiale du milieu de réaction, la dégradation de l'acide est beaucoup plus rapide que dans les cas précédents.

2^o Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

TABLEAU 26

	Mélanoïdines de			
	0	8	24	48 h.
1 heure	20	28	32	28
2 —	40	49	48	48
3 —	60	70	72	71
4 —	88	96	99	100
5 —	131	138	141	135
7 —	228	235	242	213
23,5 —	348	345	348	324
24 —	370	360	370	346
25 —	373	370	372	369
26 —	373	372	372	372

Selon le temps de préparation, on observe des effets opposés : toutes les mélanoidines accélèrent le processus, dans son début, mais, alors que les préparations de 8 heures et surtout de 24 heures, continuent d'avoir un effet favorable, celle de 48 heures inhibe manifestement de façon partielle le dégagement du gaz carbonique dans la suite de la fermentation.

b) *Levure formée.*

TABLEAU 27

	Mélanoidines de			
	0	8	24	48 h.
Poids récolté en mg.	300	287	285	280
Accroissement p. 100.	87,5	79	78	75

On remarque une inhibition faible de la croissance de la levure.

c) *Évolution des trois formes d'azote.*

TABLEAU 28

	Mélanoidines de			
	0	8	24	48 h.
N_T N_T^O	0,39	0,37	0,37	0,37
N_T N_T^R	0,16	0,18	0,24	0,24
ΔN_T	0,23	0,19	0,13	0,08
N_A N_A^O	0,39	0,14	0,10	0,07
N_A N_A^R	0,16	0	0	0
ΔN_A	0,23	0,14	0,10	0,07
N_M N_M^O	0	0,23	0,27	0,31
N_M N_M^R	0	0,18	0,24	0,28
ΔN_M	0	0,05	0,03	0,02

On constate à nouveau la bonne assimilation de l'azote aminé sous forme d'acide glutamique ; l'azote dégradé étant initialement important, on peut constater ici que l'ensemble de ces formes azotées est très mal utilisé par la levure.

d) *Alcools.*

TABLEAU 29

	Mélanoidines de :			
	0	8	24	48 h.
Ethanol	146	146	149	149
Propanols	6,7	6,7	6,8	6,8
Butanols	7,2	4,8	1,2	4,8

Il est manifeste que ces mélanoidines n'ont aucune influence sur le rendement en alcools éthylique ou propylique ; par contre, la production de butanol tend à diminuer.

e) *Acides.*

TABLEAU 30

	Mélanoidines de :			
	0	8	24	48 h.
Résiduels	7	8	7	6
Préformés	0	4	5	6
Différence	7	4	2	0

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne.*

TABLEAU 31

	Mélanoidines de :			
	0	8	24	48 h.
Glycérol	13,8	13,2	9,7	11,1
2-3 Butanediol	0,5	0,8	1	1,3
Acétoïne	0,06	0,01	0,05	0,06

On remarque une augmentation progressive du 2-3 butanediol, importante en valeur relative, avec le temps de réaction. Là encore, l'acétoïne n'est trouvée qu'en quantité si faible que ses variations ne sont guère significatives.

g) *Diacétyle, Acétone.*

TABLEAU 32

		Mélanoidines de :		
		8	24	48 h.
Diacétyle {	Résiduel	0,19	0,28	0,31
	Préformé	0,18	0,29	0,30
	Différence	0,01	-0,01	0,01
Acétone {	Résiduelle	0,14	0,19	0,20
	Préformée	0,12	0,13	0,17
	Différence	0,02	0,06	0,03

Là encore, on n'observe aucune production de diacétyle ; quant à l'acétone, les quantités apparemment formées restent très faibles.

En résumé.

Les faits principaux observés sont les suivants :

- La vitesse de dégagement du gaz carbonique est manifestement en relation avec le degré auquel la réaction de MAILLARD a été poussée.
- Le développement de la levure est quelque peu ralenti.
- La production d'éthanol n'est pas affectée par la présence de ces mélanoidines.

E — DISCUSSION

De cette exploration forcément superficielle et incomplète plusieurs conclusions se dégagent :

1^o Le fait, semble-t-il le plus important, au moins quantitativement, est l'action des mélanoidines sur le dégagement du gaz carbonique.

Dans tous les cas, le volume total recueilli dans une fermentation en présence de mélanoidines est, à la précision des mesures près, égal au volume recueilli dans la fermentation témoin. Il semble donc que les mélanoidines ne puissent pas apporter des substrats de décarboxylation et que la seule source importante de CO₂ reste l'acide pyruvique.

Mais, par contre, et de façon presque générale, on voit que les mélanoidines influent sur la vitesse de libération de l'anhydride carbonique. Les modalités de cette action varient : c'est le plus souvent un effet accélérateur, mais on a noté également une action modératrice. La nature des mélanoidines mises en jeu intervient ; il semble également que cette action puisse dépendre de la phase de fermentation : les mélanoidines de glutamate de sodium 48 h développent un effet accélérateur dans les 4 premières heures de fermentation, puis ont une influence retardatrice sur le dégagement de CO₂. Il apparaît donc que cette action peut être diverse et que différents constituants du mélange complexe que sont les mélanoidines puissent intervenir comme activateurs ou inhibiteurs.

2^o L'influence des mélanoidines s'affirme également lorsque l'on examine les rendements en levure. Tantôt leur présence est très nettement favorable (mélanoidines de glycolle), tantôt on a affaire à une inhibition qui se manifeste soit dès le début de la réaction de MAILLARD (glutamate de sodium), soit seulement après un certain temps de chauffage. Ce qui peut d'ailleurs s'expliquer par le fait que, la réactivité du glutamate de sodium étant très grande, il se forme rapidement des composés actifs qui, dans les autres cas, n'apparaissent qu'après un temps plus long.

3^o En ce qui concerne l'assimilation azotée, il apparaît que l'azote appelé ici dégradé ou azote des mélanoidines est une source encore plus mauvaise que l'acide aminé initial ; dans tous les cas, les quantités absolues d'azote dégradé disparues du milieu au cours de la fermentation sont inférieures aux quantités d'azote aminé consommées. Un seul essai semble faire exception : celui de l'asparagine ; en réalité, l'azote dit « des mélanoidines » comprend l'azote amidé, excellente source azotée pour la levure.

Le cas le plus démonstratif est celui de la mélanoidine de glutamate de sodium : la réaction de MAILLARD aboutit alors à la formation d'une proportion importante d'azote dégradé. Les conditions du dosage par différence sont alors améliorées et il

serait facile de voir avec assez de précision une disparition éventuelle de ces formes azotées. Or, les ΔN_M restent très voisins du zéro.

Dans deux circonstances — mélanoidines d'alpha-alanine et, de façon moins démonstrative, d'asparagine — il apparaît même que la présence des mélanoidines dans le milieu de fermentation abaisse les possibilités d'utilisation par la levure de l'azote aminé lui-même ; alors que 0,17 milli-atomes d'azote provenant de l'alpha-alanine sont consommés par la levure dans l'essai témoin, cette valeur tombe en moyenne, à 0,1 en présence de mélanoidines du même aminoacide.

4° En général, la production globale d'éthanol n'est pas affectée sensiblement par la présence des mélanoidines, sauf toutefois dans le cas de la mélanoidine d'asparagine où l'on observe une diminution notable et progressive (de 196 à 154 micro-môles par cc) lorsqu'augmente le temps de chauffage de la préparation étudiée.

Quant aux autres alcools, appelés ici globalement propanols et butanols, il ne paraît pas que leur production soit nettement modifiée dans ces conditions ; des techniques de séparation et de dosage plus fines que celles utilisées ici devraient être mises en œuvre pour l'établir ou l'infirmier.

5° L'acidité dosable après extraction à l'éther après fermentation reste de même à peu près constante. Mais, si l'on défalque l'acidité initiale, on observe pour l'acidité produite en cours de fermentation, une décroissance générale en fonction du temps de chauffage des mélanoidines et ceci quel que soit l'acidoacide mis en jeu. Il serait donc nécessaire d'identifier les acides préformés apportés par la mélanoidine et les acides de fermentation ; il est possible que les premiers soient consommés par la levure ; dans ce cas, il ne serait pas légitime de les défalquer de l'acidité finale.

6° Quant aux autres produits secondaires de la fermentation dont l'évolution a été examinée, ils ne subissent que des fluctuations de peu d'amplitude sous l'influence des mélanoidines.

Il en est de même des deux composés carbonylés apportés par les mélanoidines : diacétyle et acétone. Pour le premier, le bilan de la formation est constamment nul ; pour le second le bilan est en général très légèrement positif ; mais les quantités ainsi calculées restent toujours du même ordre de grandeur que les erreurs d'expérience et de calcul. Seul le fait que ces bilans sont systématiquement légèrement positifs, pourrait conduire à penser que de très faibles quantités, sinon d'acétone, du moins de composés interférant avec cette méthode de dosage, peuvent s'accumuler dans le milieu de fermentation.

Il est d'ailleurs possible que si les productions globales de certains composés ne sont pas affectées par des mélanoidines, leurs évolutions en cours de fermentation le soient comme l'est précisément celle de l'anhydride carbonique.

2. ÉTUDE PARTICULIÈRE DU DÉGAGEMENT DE CO₂.

Dans cette seconde partie du travail, nous nous sommes efforcés de préciser les caractères de l'effet accélérateur de la décarboxylation observé avec certaines mélanoidines glucose-glycocolle 24 ou 36 heures, qui développent cet effet avec une netteté suffisante.

Nous avons d'abord cherché à préciser les limites de concentration où cette influence se manifestait et l'évolution de cette action au cours de la fermentation ; un phénomène plus complexe qu'une simple activation ayant été mis en évidence,

nous avons entrepris la séparation des différentes substances actives et leur isolement grossier à partir de la mélanoidine.

1° Influence de la concentration sur l'activité des mélanoidines

Les mélanoidines de glucose et de glycolle ont été diluées à l'eau distillée et des fermentations ont été effectuées en présence de ces dilutions dans les conditions décrites précédemment.

Une série d'essais préliminaires avec des mélanoidines de 16 h, 24 h, et 36 h a donné, après un temps de fermentation de 20 h, les résultats suivants :

TABLEAU 33

Mélanoidines de	Dilutions						Témoins
	1	5	25	125	625	3125	
16 heures	264	240	235				235 cc
24 heures		240	257	253			235
36 heures	356	356	356	356	356	356	341

On voit que la dilution peut avoir des effets divers et même opposés sur l'allure de la fermentation : lorsque la dilution augmente, l'activation décroît dans le cas de la mélanoidine de 16 heures, augmente dans le cas de celle de 24 heures, reste constante pour la préparation de 36 heures.

Ces phénomènes ont été examinés de plus près au micro-Warburg sur trois préparations : de 7 h., de 24 h., 36 heures respectivement, les essais ayant été conduits de la façon suivante :

On introduit dans la fiole à fermentation :

— 1 cc du mélange de :

solution A	2,5 cc.	} ajusté à 25 cc.
solution B	7,5 cc.	
thiamine 20 γ/cc	0,5 cc.	

— 1 cc de suspension de levure apportant 0,8 mg de substance sèche.

On place dans le diverticule de cette fiole :

0,5 cc de la solution en expérience.

Après avoir chassé l'air par passage d'azote et après mise en équilibre de température à 30° C, on mélange le contenu du diverticule et celui de la fiole. On lit alors, toutes les dix minutes, pendant une heure, les pressions développées à volume constant selon la méthode classique et on calcule les volumes de gaz carbonique dégagé. Traçant la courbe de ces volumes recueillis en fonction du temps, on calcule sa pente, c'est-à-dire, la vitesse de dégagement du gaz carbonique, que l'on exprime en microlitres par minute. On rapporte ces vitesses à celles du témoin V_T prise ainsi comme unité. On obtient ainsi des rapports $\frac{V}{V_T}$ supérieurs à 1 dans le cas d'une activation des décarboxylations, inférieurs à 1 dans le cas d'une inhibition. Enfin, on trace la

courbe représentant les variations de $\frac{V}{V_T}$ en fonction du logarithme de la dilution. L'abscisse 0 correspond à une fermentation en présence de la mélanoidine à la concentration initiale ($d = 1$) ; la valeur du témoin ($d = \infty$) est atteinte asymptotiquement. Le tableau 34 et les courbes I représentent les résultats obtenus.

TABLEAU 34

Valeurs de $\frac{V}{V_T}$ en fonction de la dilution de la mélanoidine.

Temps de préparation	Dilutions						
	1	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
7 heures	1,03	1,06	1,09	1,23	1,06	1	1
24 heures	1,07	1,11	1,15	1,33	1,04	1	1
36 heures	1,03	1,05	1,20	0,83	0,92	0,96	1

Les trois courbes représentent un maximum net, correspondant à un accroissement de la vitesse de dégagement du gaz carbonique de 25 p. 100 pour les préparations de 7 h et 36 heures, et de 33 p. 100 pour la préparation de 24 heures ; ces maxima sont d'ailleurs atteints pour les valeurs très différentes de la dilution : environ 1 400 pour les mélanoidines de 7 et 24 heures, 140 seulement pour la mélanoidine de 36 heures. Cette dernière diffère également des deux autres en ce que ce maximum est suivi d'un minimum situé dans une zone de dilution de 1 400 à 1 500.

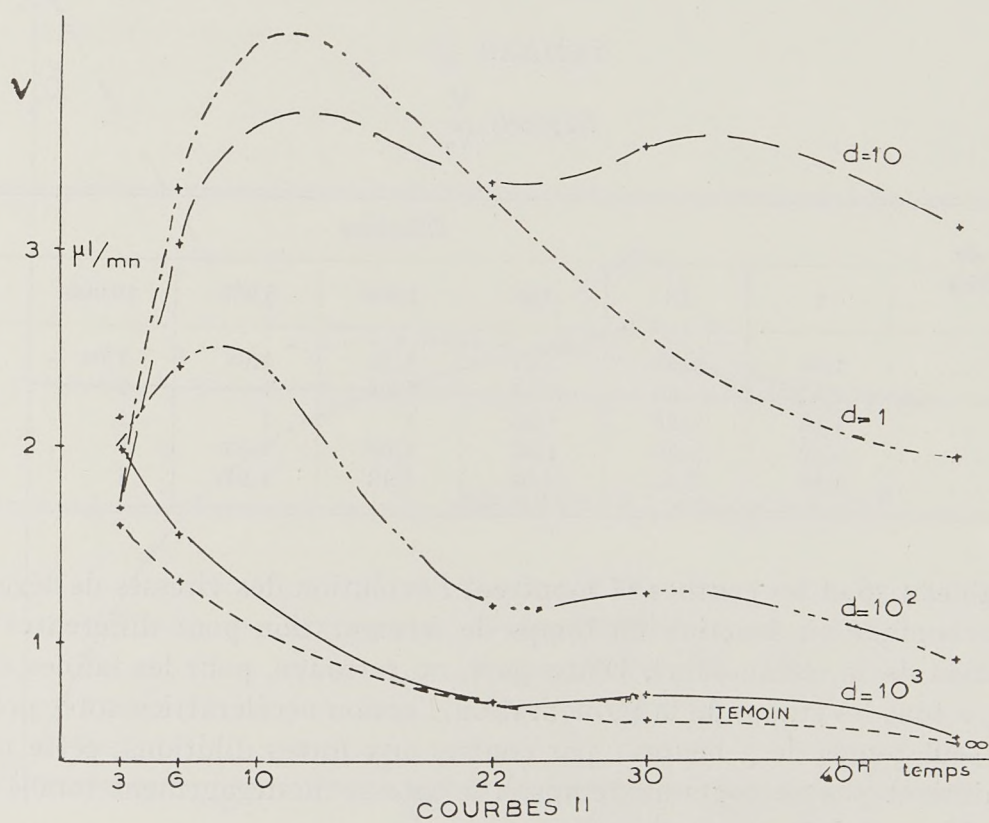
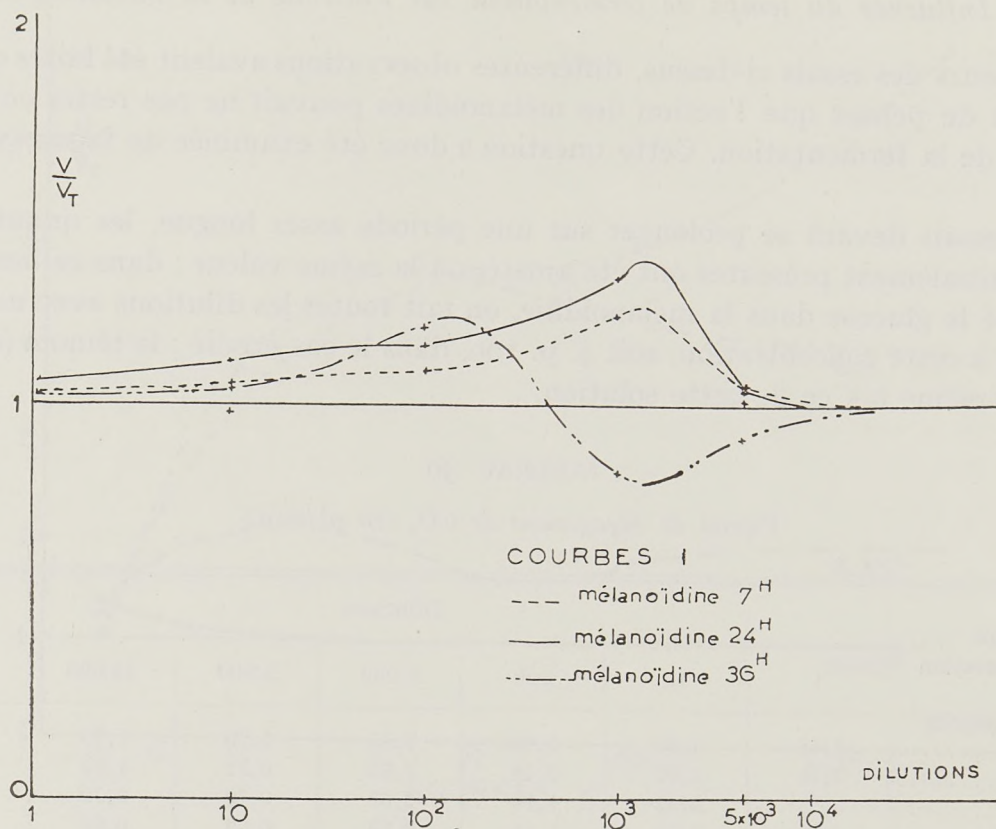
Ces essais ont été effectués avec des milieux de culture déficients en alimentation azotée, du fait que les seules sources de N sont le glycolle et ses produits de dégradation ; il était intéressant de voir ce qu'il adviendrait des résultats obtenus lorsque la levure fermenterait en milieu contenant une forme d'azote facilement assimilable. Dans ce but, les phosphates mono et bipotassiques utilisés pour la préparation de la solution A ont été remplacés par des quantités équimoléculaires de phosphates mono et bi-ammoniques. Le tableau 35 expose les résultats obtenus avec la mélanoidine de 24 heures.

TABLEAU 35

Valeurs de $\frac{V}{V_T}$ en milieu complet.

d	1	100	1 000	5 000	10 000	∞
$\frac{V}{V_T}$	0,86	1,10	1,14	1	1	1

On voit que le phénomène conserve la même allure générale mais avec une amplitude beaucoup moindre, l'accélération maximum obtenue alors n'étant que de l'ordre de 15 p. 100.



2° Influence du temps de fermentation sur l'activité de la mélanoidine

Au cours des essais ci-dessus, différentes observations avaient été faites qui permettaient de penser que l'action des mélanoidines pouvait ne pas rester constante au cours de la fermentation. Cette question a donc été examinée de façon systématique.

Les essais devant se prolonger sur une période assez longue, les quantités de glucose initialement présentes ont été ajustées à la même valeur ; dans ce but, après avoir dosé le glucose dans la mélanoidine, on fait toutes les dilutions avec une solution pure à cette concentration, soit 4. p. 100, dans le cas étudié ; le témoin ($d = \infty$) reçoit lui-même 0,5 cc de cette solution.

TABLEAU 36

Vitesse de dégagement de CO_2 (en $\mu l/min.$)

Temps de fermentation	Dilutions						
	1	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
3 heures	1,66	1,68	1,98	2,15	1,73	1,66	1,60
6 heures	3,31	3,02	2,40	1,55	0,31	1,32	1,31
22 heures	3,27	3,35	1,18	0,69	0,70	0,70	0,70
30 heures	2,57	3,53	1,25	0,73	0,73	0,68	0,60
46 heures	1,94	3,13	0,90	0,50	0,47	0,53	0,48

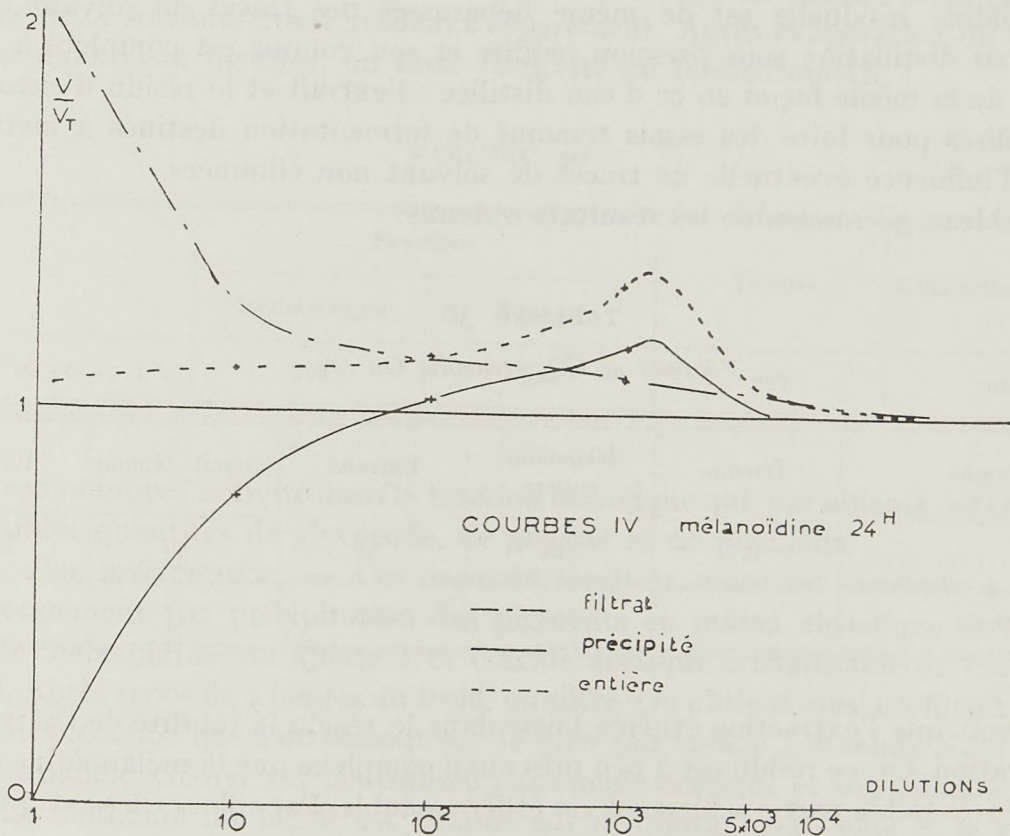
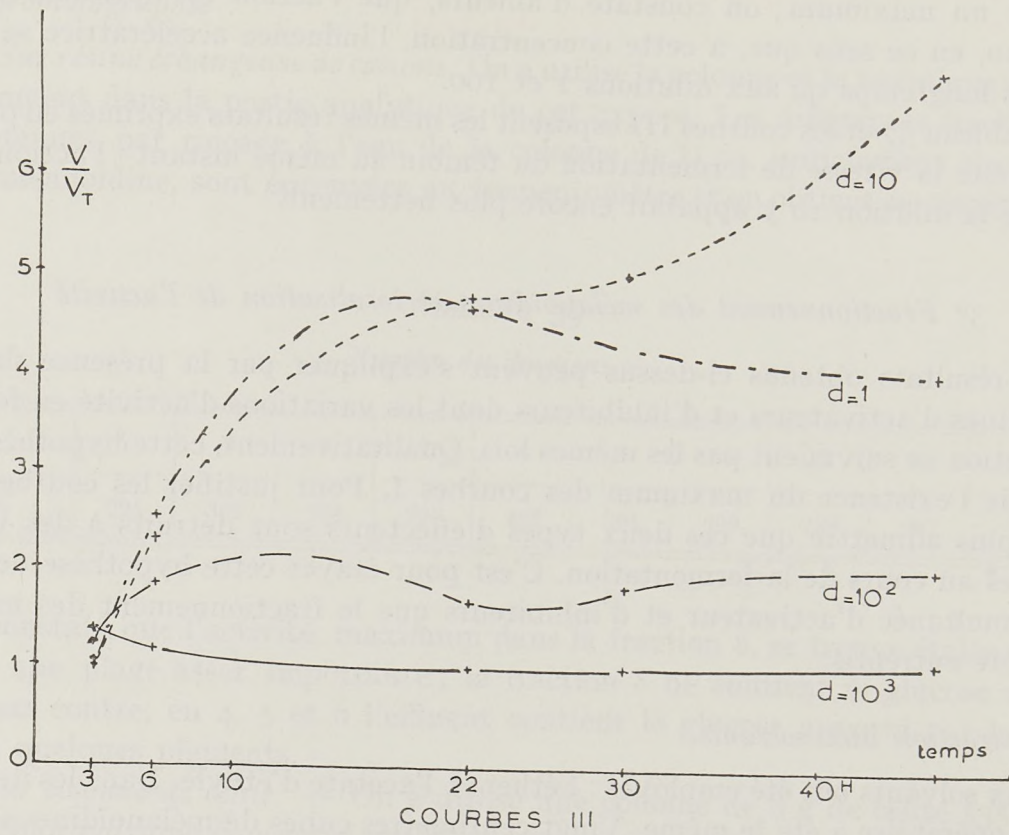
TABLEAU 37

Rapports $\frac{V}{\bar{V}_T}$

Temps de fermentation	Dilutions						
	1	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
3 heures	1,04	1,05	1,24	1,34	1,08	1,04	1
6 heures	2,52	2,30	1,83	1,18	1	1	1
22 heures	4,66	4,78	1,68	1	1	1	1
30 heures	4,30	5,03	1,87	1,09	1,03	1	1
46 heures	4,05	7,14	2,04	1,13	1,04	1	1

Le tableau 36 et les courbes II montrent l'évolution des vitesses de dégagement du gaz carbonique en fonction du temps de fermentation pour différentes valeurs de la dilution de la mélanoidine. D'une part, on retrouve, pour les faibles dilutions ($d < 100$), à tous les stades de la fermentation, l'action accélératrice notée précédemment au seul temps de 3 heures ; par contre, aux fortes dilutions, cette influence ne se maintient pas au cours du temps et la vitesse de dégagement tombe plus ou moins rapidement à la valeur de celle du témoin.

D'autre part, alors qu'aux faibles concentrations, la vitesse ne fait que décroître dans l'intervalle de temps examiné, aux plus fortes concentrations cette vitesse



passé par un maximum ; on constate d'ailleurs, que l'action est optimum pour la dilution 10, en ce sens que, à cette concentration, l'influence accélératrice se maintient plus longtemps qu'aux dilutions 1 et 100.

Le tableau 37 et les courbes III exposent les mêmes résultats exprimés en prenant comme unité la vitesse de fermentation du témoin au même instant ; l'action particulière de la dilution 10 y apparaît encore plus nettement.

3° Fractionnement des mélanoidines et localisation de l'activité

Les résultats obtenus ci-dessus peuvent s'expliquer par la présence dans les mélanoidines d'activateurs et d'inhibiteurs dont les variations d'activité en fonction de la dilution ne suivraient pas les mêmes lois. Qualitativement, cette hypothèse rend compte de l'existence du maximum des courbes I. Pour justifier les courbes II, il faut de plus admettre que ces deux types d'effecteurs sont détruits à des vitesses différentes au cours de la fermentation, C'est pour étayer cette hypothèse de l'existence simultanée d'activateur et d'inhibiteurs que le fractionnement des mélanoidines a été entrepris.

A — Extraction aux solvants.

Deux solvants ont été employés : l'éther et l'acétate d'éthyle. Dans les deux cas, le mode opératoire a été le même. Vingt centimètres cubes de mélanoidines sont extraits en continu pendant 24 heures ; le solvant est ensuite éliminé complètement par distillation sous-vide à basse température et l'extrait sec est repris par 20 cc d'eau ; la mélanoidine résiduelle est de même débarrassée des traces de solvant qu'elle contient par distillation sous pression réduite et son volume est complété à 40 cc. On traite de la même façon 20 cc d'eau distillée : l'extrait et le résidu d'extraction seront utilisés pour faire des essais témoins de fermentation destinés à mettre en évidence l'influence éventuelle de traces de solvant non éliminées.

Le tableau 38 rassemble les résultats obtenus.

TABLEAU 38
Volumes de CO₂ recueillis (en cc)

Solvants	Témoin	Mélanoidine entière	Extraits	Extrait témoin	Résidu
Ether	177	207	49	50	202
Acétate d'éthyle	322	340	335	321	338

On voit que l'extraction étherée laisse dans le résidu la totalité de l'activité de la préparation. Or, ce résidu est à peu près aussi complexe que la mélanoidine entière dont une très faible partie seulement est éthero-soluble. Par ailleurs, les extraits étherés inhibent complètement la fermentation.

L'acétate d'éthyle n'apporte pas non plus de résultats intéressants, l'activité de l'extrait étant égale à celle du résidu d'extraction.

B — Chromatographie :

— *Sur résine échangeuse de cations.* On a utilisé la colonne et la technique décrites précédemment dans la partie analytique de cet exposé. Les différentes fractions de 15 cc obtenues par rinçage à l'eau de la colonne de D 50, initialement chargée de 5 cc de mélanoidine, sont éprouvées au fermentomètre et on obtient les résultats suivants :

TABEAU 39

Numéro des fractions :

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Témoin
CO ₂ recueilli	294	302	298	299	308	301	290	288	287	286

On constate que l'activité, maximum dans la fraction 8, se trouve étalée cependant sur une plage assez importante ; la fraction 8 ne contient ni glucose ni pigments ; par contre, en 4, 5 et 6 l'effluent contient le glucose apporté par la prise d'essai et quelques pigments.

— *Sur colonne de célite.* — On a utilisé une colonne de 8 g de célite 535 lavée à l'acide chlorhydrique concentré par macération de 15 heures puis, à l'eau distillée jusqu'à neutralité ; enfin, séchée à l'air libre, puis à 150° C.

5 cc de mélanoidine sont versés sur cette colonne qui est ensuite lavée par 50 cc d'eau, ces deux solvants étant recueillis séparément. Après évaporation du solvant et reprise dans l'eau distillée, on teste l'activité au fermentomètre :

TABEAU 40

	Fractions		Témoin	Mélanoidine entière
	Méthanolique	Aqueuse		
CO ₂ dégagé en cc.	309	288	287	308

On trouve toute l'activité dans la fraction alcoolique qui, par ailleurs, ne contient que de faibles quantités de glycolle, de glucose et de pigments.

C — *Par précipitation.* — Ces derniers résultats nous ont conduits à tenter un fractionnement par précipitation des pigments en milieu alcoolique et acide : à 10 cc de mélanoidine, on ajoute 1 cc d'acide acétique cristallisable et 100 cc de méthanol. Après repos de 2 heures au froid, on filtre. On obtient ainsi un filtrat alcoolique et un précipité que l'on dissout sur le filtre par lavage à la soude N/50 ; cette solution fortement colorée est neutralisée par l'acide acétique et son volume ajusté à 20 cc. Le méthanol du filtrat est éliminé par distillation sous-vide et le volume ajusté également à 20 cc. Les deux solutions ainsi obtenues, filtrat et précipité, sont testées au micro-Warburg en fonction de leur dilution.

Les résultats obtenus avec des mélanoidines de 24 et de 36 heures, sont rassem-

blés dans le tableau 41 et les courbes IV où les valeurs $\frac{V}{V_T}$ sont données en fonction de la dilution.

TABLEAU 41

Mélanoidines	Dilutions							
	1	5	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
Entière	1,07		1,10	1,14	1,33	1,06	1,03	1
24 h. Filtrat		1,65	1,22	1,15	1,10	1,06	1,03	1
Précipité		0	0,79	1,04	1,16	1	1	1
Entière	1		1,03	1,19	0,93	0,99	0,98	1
36 h. Filtrat	1,95		1,82	1,22	0,76	0,97	1	1
Précipité	0		0,16	1,22	1,13	1	1	1

On constate que les pourcentages d'accroissement d'activité calculés pour le filtrat et le précipité, sont additifs et que leur somme est sensiblement égale à la valeur trouvée directement pour la mélanoidine entière :

$$\frac{V - V_T}{V_T} = \frac{V_T}{V} - 1$$

$$\left[\frac{V - V_T}{V_T} \right]_F + \left[\frac{V - V_T}{V_T} \right]_P \simeq \left[\frac{V - V_T}{V_T} \right]_M$$

ou :

$$\left[\frac{V}{V_T} \right]_F + \left[\frac{V}{V_T} \right]_P - 1 \simeq \left[\frac{V}{V_T} \right]_M.$$

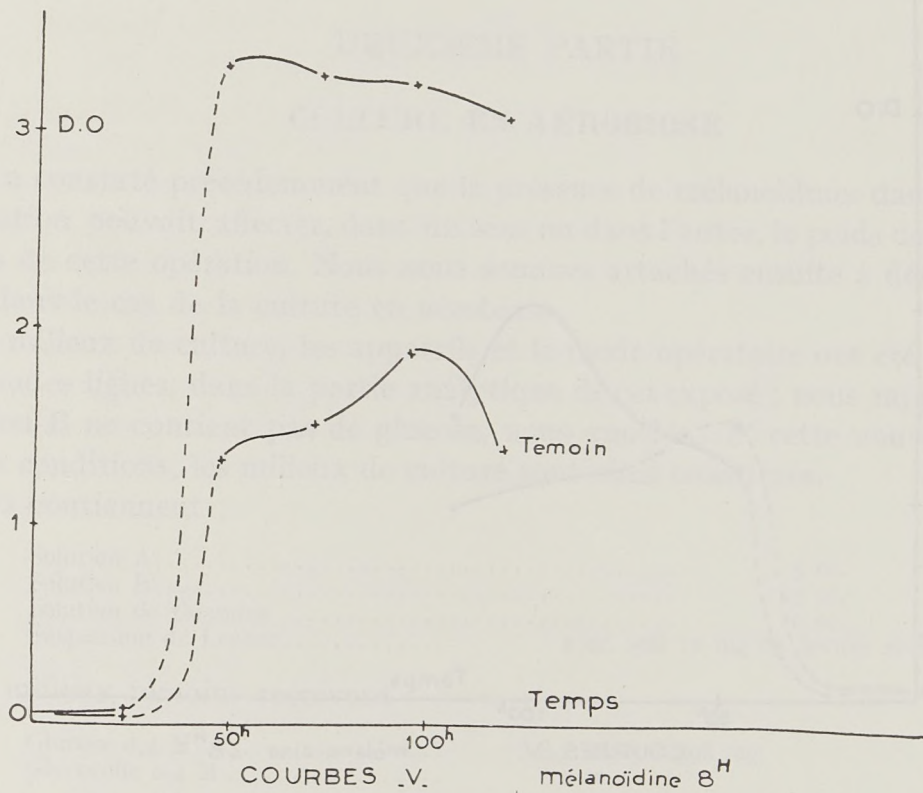
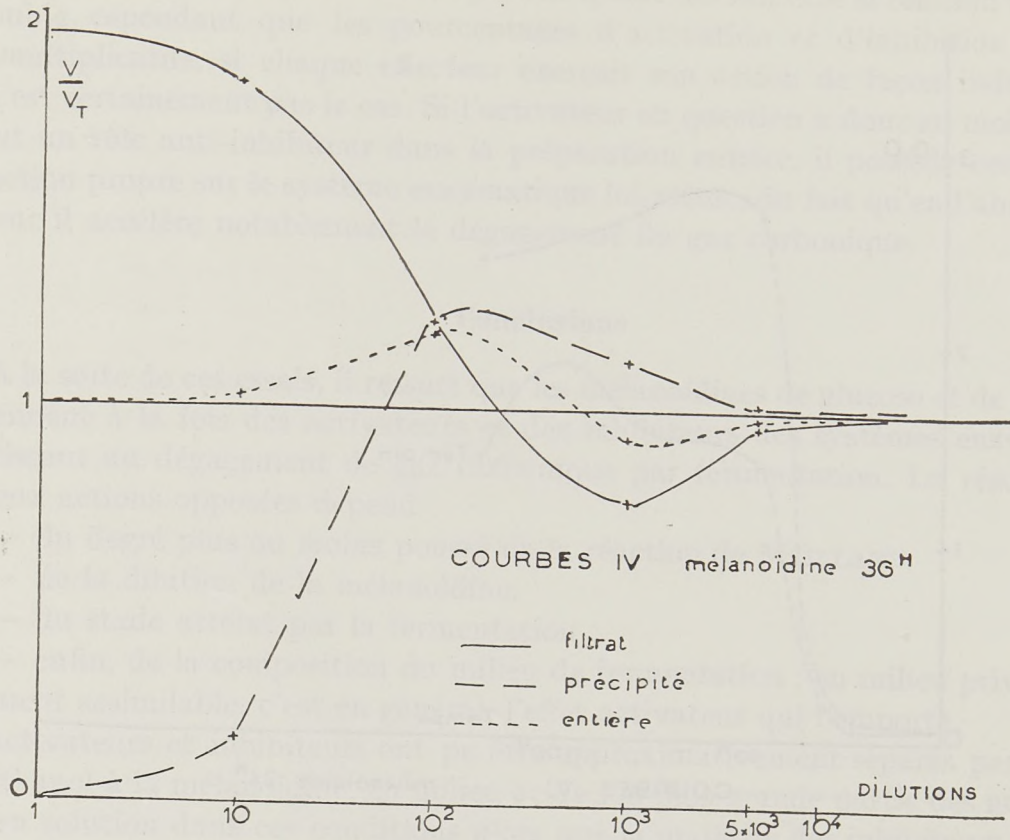
Le tableau 42 montre les résultats obtenus :

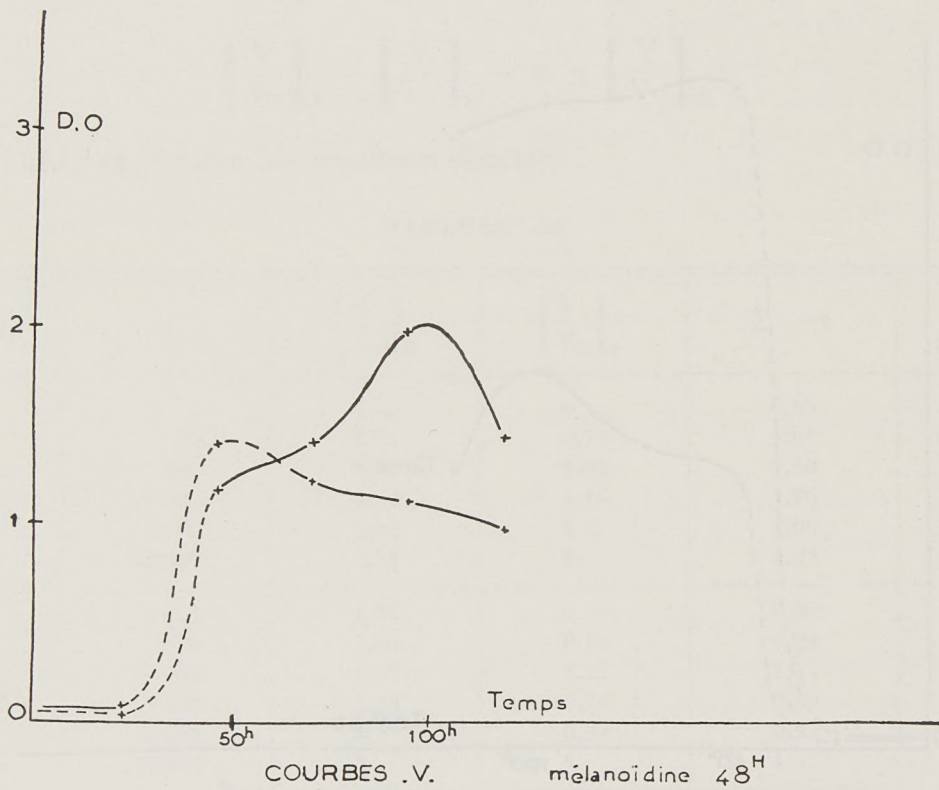
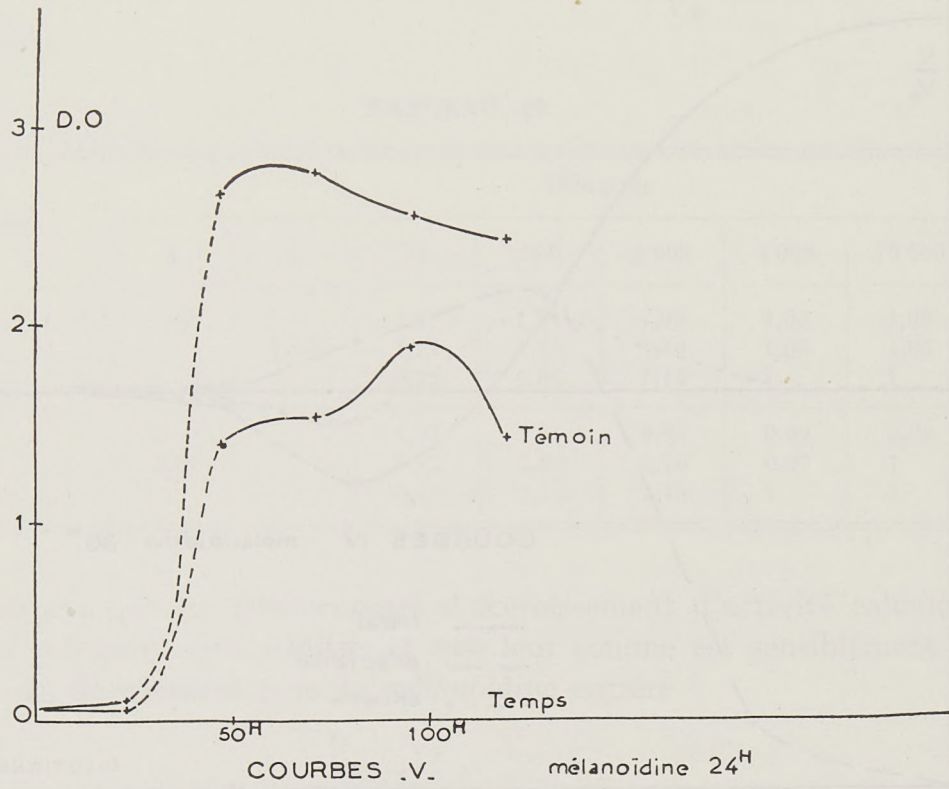
TABLEAU 42

Mélanoidine	d	$\left[\frac{V}{V_T} \right]_F$	$\left[\frac{V}{V_T} \right]_P$	$\Sigma - 1$	$\left[\frac{V}{V_T} \right]_M$
24 heures	5	1,65	0	0,65	1,10
	10	1,22	0,79	1,01	1,11
	100	1,15	1,04	1,19	1,19
	1 000	1,10	1,16	1,26	1,33
	5 000	1,06	1	1,06	1,06
	10 000	1,03	1	1,03	1,03
36 heures	1	1,95	0	0,95	1
	10	1,82	0,16	0,98	1,03
	100	1,22	1,22	1,44	1,19
	1 000	1,13	0,76	0,89	0,93
	5 000	1	0,97	0,97	0,99
	10 000	1	1	1	0,98

Sauf dans deux cas relatifs aux dilutions 5 et 100 des mélanoidines 24 et 36 heures respectivement, la relation d'additivité est assez bien établie.

Etant donné notre manque actuel de connaissance sur le mécanisme de l'acti-





vation enzymatique, il est difficile de prévoir quelle devrait être la relation théorique ; il semble cependant que les pourcentages d'activation et d'inhibition devraient être multiplicatifs, si chaque effecteur exerçait son action de façon indépendante. Tel n'est certainement pas le cas. Si l'activateur en question a donc au moins partiellement un rôle anti-inhibiteur dans la préparation entière, il possède certainement une action propre sur le système enzymatique lui-même, du fait qu'en l'absence d'inhibiteur il accélère notablement le dégagement du gaz carbonique.

Conclusions

A la suite de ces essais, il ressort que les mélanoidines de glucose et de glyocolle contiennent à la fois des activateurs et des inhibiteurs des systèmes enzymatiques aboutissant au dégagement de gaz carbonique par fermentation. La résultante de ces deux actions opposées dépend :

- du degré plus ou moins poussé de la réaction de MAILLARD.
- de la dilution de la mélanoidine.
- du stade atteint par la fermentation.
- enfin, de la composition du milieu de fermentation ; en milieu privé d'azote facilement assimilable, c'est en général, l'effet activateur qui l'emporte.

Activateurs et inhibiteurs ont pu être approximativement séparés par addition de méthanol à la mélanoidine, en milieu acide : la plus grande partie des activateurs reste en solution dans ces conditions alors que la majorité des inhibiteurs se trouve précipités.

DEUXIÈME PARTIE

CULTURE EN AÉROBIOSE

On a constaté précédemment que la présence de mélanoidines dans le milieu de fermentation pouvait affecter, dans un sens ou dans l'autre, le poids de levure formé au cours de cette opération. Nous nous sommes attachés ensuite à définir cette influence dans le cas de la culture en aérobiose.

Les milieux de culture, les appareils et le mode opératoire ont été décrits, dans leurs grandes lignes, dans la partie analytique de cet exposé ; nous rappellerons que la solution B ne contient pas de glucose, nous appelons B' cette nouvelle solution. Dans ces conditions, les milieux de culture sont ainsi constitués.

Tous contiennent :

Solution A.....	5 cc.
Solution B'.....	15 cc.
Solution de thiamine.....	20 cc.
Suspension de Levure.....	2 cc. soit 10 mg de levure sèche.

Les milieux témoins reçoivent :

Glucose 0,4 M.....	8,3 cc. soit 598 mg
Glyocolle 0,4 M.....	10 cc.

Les milieux en expérience reçoivent :

Mélanoidine.....	10 cc.
Glucose 0,4 M.....	une quantité telle que la teneur totale en glucose soit de 598 mg.

Le volume total est amené à 100 cc.

Les cultures sont maintenues à 28° C avec insufflation d'air divisé au débit approximatif de 200 cc par minute.

On suit le développement de la levure en effectuant des prélèvements de 5 cc aux temps convenables. Cette prise d'essai est centrifugé et le culot de levure est lavé complètement, puis, mis en suspension dans 5 cc d'une solution de carbonate de soude à 0,1 p. 100. On mesure la turbidité à 550 m μ .

Les essais ont été conduits en double, mais non simultanément.

Les résultats obtenus avec des mélanoidines de glucose-glycocolle de 8 h, 24 h et 48 heures sont rassemblés dans les tableaux suivants, et illustrés par les courbes.

TABLEAU 43

Mélanoidine glucose-glycocolle 8 h.

Temps de culture	Témoins			Essais avec mélanoidine		
	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne
23 h	46	42	44	63	62	61
46 h	1 360	1 355	1 350	3 340	3 365	3 353
71 h	1 560	1 530	1 445	3 300	3 293	3 296
95 h	1 960	1 899	1 925	3 250	3 228	3 239
119 h	1 460	1 412	1 436	3 100	3 065	3 082

TABLEAU 44

Mélanoidine glucose-glycocolle 24 h.

Temps de culture	Témoins			Essais avec mélanoidine		
	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne
23 h	45	43	44	94	87	90
47 h	1 410	1 328	1 399	2 675	2 630	2 633
71 h	1 520	1 540	1 530	2 740	2 799	2 765
95 h	1 902	1 885	1 894	2 530	2 580	2 555
119 h	1 399	1 430	1 415	2 410	2 470	2 440

TABLEAU 45

Mélanoidine glucose-glycocolle 48 h.

Temps de culture	Témoins			Essais avec mélanoidine		
	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne
23 h	40	42	41	75	78	77
47 h	1 152	1 205	1 177	1 360	1 409	1 385
71 h	1 399	1 460	1 430	1 192	1 205	1 199
95 h	1 980	1 970	1 975	1 091	1 103	1 097
119 h	1 410	1 420	1 415	905	970	937

Dans les trois cas, l'influence de la mélanoidine sur la multiplication de la levure dans nos conditions opératoires se manifeste de façon très nette : en présence de mélanoidine de 8 heures, le rendement en levure est pratiquement doublé ; une mélanoidine de 24 heures, augmente encore ce rendement de 70 p. 100 ; par contre, en présence de mélanoidine de 48 heures, on observe une inhibition importante, d'environ 35 p. 100.

IV. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons examiné le comportement de la levure en présence de différentes mélanoidines dans diverses conditions. D'une façon générale, on peut affirmer que la levure répond, de quelque façon, à la présence de mélanoidines dans le milieu où elle se développe. Mais la forme de cette réponse dépend de nombreux paramètres, dont beaucoup sont d'ailleurs à rapporter à la complexité et à la diversité des milieux rassemblés sous ce terme unique de mélanoidines.

En fermentation, le phénomène le plus général et quantitativement le plus important, est une action sur la vitesse de dégagement du gaz carbonique. Dans le cas particulier des mélanoidines de glucose et de glycolle, il est apparu que la réaction de MAILLARD entraîne la formation de deux types opposés d'effecteurs -activateurs et inhibiteurs — dont les proportions varient avec le stade atteint par la réaction et dont la résultante dépend en particulier de la concentration à laquelle ils se trouvent finalement amenés dans le milieu de culture.

De plus, il apparaît également que, très généralement, la réaction de MAILLARD diminue plutôt les possibilités d'assimilation — déjà minimales — de l'azote aminé par la levure : non seulement l'ensemble des formes dégradées de l'azote ne sont pas utilisées elles-mêmes, mais souvent la présence des mélanoidines tend à diminuer l'assimilation de la forme aminée ; en tout cas, elle ne la favorise jamais.

Enfin, il ne semble pas que les mélanoidines affectent de façon importante le bilan général de la fermentation ; mais on ne peut exclure a priori l'hypothèse d'une action sur la cinétique des différentes productions, analogue à celle mise en évidence pour la production du gaz carbonique.

En aérobiose, dans un milieu où l'azote est apporté par le glycolle, donc en présence d'une source azotée de mauvaise qualité, les mélanoidines se sont montrées des agents actifs, non seulement sur la vitesse de croissance, mais aussi sur le rendement en levure de la culture. Là encore, le degré auquel la réaction de MAILLARD a été poussée conditionne le sens de son influence : à la fois accélératrice de la vitesse du développement et favorable au rendement en début de réaction, celle-ci devient inhibitrice lorsque la réaction est poursuivie jusqu'à un stade plus avancé. On retrouve ici, aussi nettement qu'en fermentation, la preuve de l'existence dans les mélanoidines de deux catégories d'effecteurs d'actions opposées, activateurs et inhibiteurs de différents systèmes enzymatiques. Le fait que les activateurs sont prédominants dans les premiers stades et que les inhibiteurs l'emportent progressivement lorsque se déroule la réaction de MAILLARD, laisse penser que les premiers sont constitués par des formes moléculaires relativement simples, alors que les seconds se rapprochent des polymères terminaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) MAILLARD L. C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres. Formation des mélanoidines par voie méthodique. *C.R. Ac. Sci.*, **154**, 66-68.
- (2) ENDERS C., 1938. Zur Kenntnis der Melanoidine. *Kolloid. Z.*, **85**, 74-87.
- (3) DANEHY J. P., PIGMAN W. W., 1951. — Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. *Adv. Food. Res.*, **3**, 241-290.
- (4) HODGE J. E., 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *Agr. Food Chem.*, **1**, 928-943.
- (5) ELLIS G. P., 1959. The Maillard reaction. *Adv. Carb. Chem.*, **14**, 63-136.
- (6) CHICHESTER C. O., STADTMAN F. H.; MAC KINNEY G. On the products of the Maillard réaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3-418-3-420.
- (7) CREMER H. D., MENDEN E., 1956. Ueber nicht-enzymatische Bräunungsreaktionen und ihre physiologischen Folgen. *Zeitsch. Lebensm. Unters, Forsch.*, **104**, 33-43.
- (8) DZIERZBICKI A., 1909. Influence of humus substances upon the development of yeast and upon alcoholic fermentation. *Anz. Akad. Wissensch. Krakau*, 651-660 (d'après *Biochem. Cents.*, **9**, 704).
- (9) PETERSON R., ROSE D., LOEB L., 1949. Influence of the amino-acid-dextrose reaction on the growth of *Bacillus Polymyxa*. *Can. J. Res.*, **27** Sect C., 269-273.
- (10) ZABRODSKII A. G., TIKHOMIROVA E. I., 1958. Effects of melanoïd compounds on mash microflora. *Mikrob.*, **27**, 127-130.
- (11) CHELDELIN V. H., KING T. E., 1953. Nutrition of micro-organisms. *Ann. Rev. Microb.*, **7**, 113.
- (12) SHAFFER P. A., HARTMANN A. F., 1920-21. The iodometric determination of copper and its use in sugar analysis. II. — Methods for the determination of reducing sugars in blood, wine, milk and other solutions. *J. Biol. Chem.*, **45**, 365-390.
- (13) THOMPSON J. F., ZACHARIUS P. M., STEWARD F. C., 1951. Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. — The reactions of nitrogen compounds with ninhydrin on paper : a quantitative procedure. *Plant Physiol.*, **26**, 275-394.
- (14) NEISH A. C., 1951. Analysis of mixtures of simple aliphatic alcohols by partition chromatography. *Can. J. Chem.*, **29**, 552-557.
- (15) WESTERFIELD W. W., 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.*, **161**, 495-502.
- (16) WHITE A. G. C., KRAMPITZ L. O., WERKMAN C. H., 1946. Method for the direct determination of diacetyl in tissue and bacterial filtrates. *Arch. Biochem.*, **9**, 229-234.

ÉTUDES SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES DES VINS

E. PEYNAUD et S. DOMERCQ

Station agronomique et œnologique, Bordeaux.

PLAN DU MÉMOIRE

- I. — INTRODUCTION.
- II. — TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE CULTURE.
Écologie et répartition des bactéries.
- III. — TESTS DE CLASSIFICATION.
 - A. Fermentation des différents métabolites.
 - B. Hétéro- et homofermentation, pH limites.
- IV. — ATTAQUE DU MÉSOINOSITOL.
- V. — NUTRITION AZOTÉE DES BACTÉRIES LACTIQUES.
- VI. — POSSIBILITÉ DE PROVOQUER LA FERMENTATION MALOLACTIQUE A L'AIDE DE BACTÉRIES CULTIVÉES.
 - A. Préparation des levains.
 - B. Exemple d'essais de laboratoire.
 - C. Applications pratiques.
- VII. — ACTION DU LYSOZYME SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES.
- VIII. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

I. — INTRODUCTION

Dans le domaine de la recherche bactérienne en œnologie, les quinze dernières années ont été marquées par le développement des travaux sur la fermentation malolactique. Ce développement s'est effectué en profondeur par une meilleure connaissance de ce phénomène, de ses agents, de son mécanisme, de ses facteurs, et il s'est effectué également en surface par un nombre toujours plus grand d'observations et de recherches conduites dans les régions vinicoles intéressées. Mais on remarque cependant que l'application des connaissances sur ce sujet si important n'est entrée que lentement dans la pratique des différentes régions, qui ont dû en faire la découverte l'une après l'autre. La mise en place ne s'est pas effectuée sans difficulté. On comprend que la complication des méthodes de vinification résultant de ces notions,

à l'opposé de certaines thèses simplistes, ait soulevé des résistances, aussi sans doute la nécessité de modifier des doctrines périmées mais généralement admises. C'est cependant pour nous un sujet d'étonnement que les obstacles qu'a dû vaincre la diffusion de ces notions pourtant solidement établies et finalement partout confirmées.

Peu à peu chaque région conquise devient un centre d'étude et on peut dire que toutes les stations d'œnologie ont eu plus ou moins pendant cette période l'étude de la fermentation malolactique à leur programme de recherches. Le problème d'actualité est de pouvoir diriger cette fermentation, d'en maîtriser les conditions pour arriver à l'obtenir aisément dans les délais souhaités. D'une façon générale les bactéries qui occasionnent les maladies des vins ont été beaucoup moins étudiées pendant la même période.

Pour notre part, nous avons adopté à la Station œnologique de Bordeaux un programme complet de recherches sur les bactéries lactiques, calqué sur celui qui a été réalisé pour les levures, entre 1951 et 1958. Ce programme prévoit l'étude de la systématique, de la morphologie, de l'écologie des bactéries lactiques du vin, la description détaillée des principales espèces, la détermination de leurs caractères physiologiques, des conditions de leur développement, de l'influence des facteurs de croissance, du mécanisme chimique des diverses fermentations lactiques, des transformations de la composition des vins qu'elles provoquent, etc. Ce programme est encore loin d'être réalisé ; une semblable étude demandera plusieurs années. D'ailleurs, à cet édifice, des assises manquent encore puisque la classification des bactéries lactiques est incertaine et inachevée ; or on sait qu'une étude physiologique n'a son plein intérêt qu'appliquée à des microorganismes, sinon absolument catalogués, du moins bien définis. Une classification à caractère œnologique paraît possible et sera le premier objectif de nos travaux.

II. — TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE CULTURE

Un milieu naturel comme le moût ou le vin peut renfermer un nombre plus ou moins grand d'espèces différentes de bactéries lactiques et en proportions très variables. De plus ces bactéries se trouvent mêlées à des mycodermes, à des levures, à des bactéries acétiques. Il est donc indispensable pour l'étude des bactéries lactiques de les séparer et d'obtenir des cultures pures renfermant chacune un seul microorganisme. L'intérêt théorique est l'étude des propriétés physiologiques de souches bien définies. L'intérêt pratique est la recherche d'une bactérie aussi bien adaptée que possible à une transformation déterminée ; c'est particulièrement le cas de la fermentation malolactique.

Pour l'isolement des bactéries une méthode courante est la dilution en milieu solide. RIBÉREAU-GAYON l'avait utilisée dans ses recherches sur les bactéries du vin de 1935 à 1942 (1).

Nous utilisons la technique suivante d'isolement. On centrifuge une prise de 10 cm³ environ de vin ayant subi la fermentation malolactique ou une altération microbienne. Après quelques secondes de rotation, on transvase le liquide dans un deuxième tube afin d'éliminer le dépôt le plus lourd constitué surtout de levures. On centrifuge de nouveau pendant dix minutes et on élimine le liquide. On remet le dépôt en suspension dans la goutte qui reste au fond du tube et avec cette sus-

pension concentrée on ensemence deux tubes d'un milieu de culture contenant 20 mg par l d'actidione. L'addition de cet antibiotique a pour but d'éviter la multiplication parasite des levures et des moisissures.

L'incubation se fait en anaérobiose pour éviter le développement des microorganismes aérobies ; par exemple on enfonce légèrement le bouchon de ouate du tube de culture, on introduit une petite bande pliée de papier filtre contenant du pyrogallol et roulée à la dimension du diamètre du tube ; on imbibe de quelques gouttes de soude ou de potasse concentrée et on bouche aussitôt de manière étanche avec un bouchon de caoutchouc. Les tubes sont mis à incuber à 28 ou 30° C pendant le temps nécessaire pour observer un développement suffisant des colonies. A ce moment on homogénéise et ensemence deux boîtes de Pétri avec deux dilutions différentes de la culture d'enrichissement, sur le même milieu, solidifié par addition de gélose à 3 p. 100. Les boîtes de Pétri sont placées en atmosphère privée d'oxygène à une température ne dépassant pas 25° C (à cause de la facilité de liquéfaction de la gélose en milieu acide) ; ces conditions sont obtenues dans un bocal de conserve de 1 l, à fermeture hermétique, contenant dans un petit récipient 20 g de pyrogallol sur lequel on verse 40 cm³ de soude 10 N en fermant le couvercle.

L'anaérobiose est utilisée pendant l'isolement des cultures beaucoup plus pour éviter l'envahissement des boîtes de Pétri par les bactéries acétiques, les mycodermes et les moisissures, que pour faciliter la multiplication des bactéries lactiques ; ce sont des anaérobies facultatifs ou microaérophiles, et le contact ménagé de l'air n'empêche pas leur développement. Par la suite les cultures pures peuvent être faites sans précautions spéciales, en tubes bouchés simplement d'un tampon de ouate.

Quand les colonies sont bien visibles sur les boîtes de Pétri, on en prélève un certain nombre au fil de platine, que l'on ensemence isolément dans des tubes du milieu de culture choisi. Les colonies sont très petites ; on les prélève de préférence sur la boîte la plus diluée où les colonies sont plus dispersées. L'incubation se fait à 28°C et dure cinq à dix jours. Ensuite les tubes sont conservés au réfrigérateur et repiqués tous les deux mois.

La bibliographie offre un grand nombre de formules de milieux de culture pour bactéries, mais tous ne conviennent pas aux bactéries du vin. Ces bactéries sont réputées difficiles à cultiver et on a cru pendant longtemps que les bactéries de la fermentation malolactique ne pouvaient se développer sur milieu synthétique. On réussit parfaitement à les cultiver sur des milieux qui se rapprochent le plus de leur habitat naturel, sur lesquels elles conservent leurs propriétés et peuvent se multiplier suffisamment. Le pH du milieu de culture a d'abord une influence déterminante : les bactéries du vin ne se développent pas à des pH élevés, ni à des pH trop bas ; la zone de pH convenable est située entre pH 3,0-3,5 et 5,0. On emploie de préférence des milieux à base de jus de raisins ajustés au pH voulu. Ce milieu naturel apporte les substances nécessaires aux bactéries pour leur multiplication ; il contient de l'acide malique naturel (forme gauche), des sucres, des facteurs de croissance, etc., mais il est généralement trop pauvre en substances azotées.

Après l'essai de nombreux milieux de culture, nous avons adopté un milieu constitué de jus de raisin étendu de son volume d'eau pour diminuer sa richesse en sucres, enrichi en azote et autres facteurs de croissance par 5 g par l d'extrait soluble de levure, et dont le pH a été porté à 4,2, pH qui s'est révélé être optimum pour la multiplication des bactéries lactiques du vin. Ce milieu contenait environ 3 g d'acide

malique par 1 (sinon on peut l'enrichir en cet acide) et 80 g de sucres constitués presque à parties égales de glucose et de fructose. Pour les milieux d'isolement on ajoute toujours 20 mg par 1 d'actidione.

Les bactéries lactiques du vin sont souvent des bactéries à développement lent. Dans la pratique de la conservation des vins, avant qu'une fermentation bactérienne ou une altération se déclare, l'incubation peut durer plusieurs mois, car les conditions de milieu sont généralement à la limite des possibilités de multiplication. Pour que l'isolement ne livre pas seulement des bactéries à croissance rapide, il est nécessaire de conserver les milieux solides ou liquides pendant plusieurs semaines après l'ensemencement.

Ecologie et répartition des bactéries. — On peut penser que les bactéries se trouvent au moment des vendanges sur les raisins mûrs, où elles sont retenues par la pruine de la pellicule, comme le sont les levures, les mycodermes et les moisissures. Les bactéries acétiques y sont faciles à identifier ; elles se manifestent parfois par l'altération des grains blessés. A notre connaissance, la recherche sur les raisins de bactéries lactiques n'a pas encore fait l'objet de travaux systématiques ; on ne peut que supposer leur présence par le recoupement que permettent certaines observations. RADLER (2) a isolé sur les feuilles de vigne des bactéries capables de faire fermenter l'acide malique. OCHS (3) pense même que les bactéries de la fermentation malolactique peuvent provoquer une maladie de la vigne qui se traduit par un flétrissement de la rafle et du fruit. La répartition des bactéries dans les vignobles semble cependant très irrégulière. En effet on observe dans la pratique que chaque année la fermentation malolactique s'effectue plus difficilement dans les vins de certaines propriétés ou de certaines régions que dans d'autres, sans que la composition du raisin permette d'expliquer ces différences. Pour WEBB et INGRAHAM (4), le levain pour une fermentation malolactique spontanée est présent dans le chai et n'est pas apporté par les raisins.

Au début de la fermentation alcoolique la présence des bactéries passe inaperçue, parce que la multiplication des levures est beaucoup plus rapide et plus abondante, mais l'observation au microscope au quatrième ou cinquième jour de la fermentation en cuve de bactéries de diverses formes, qui a été faite depuis longtemps, est la preuve logique de leur présence dans la vendange. Ce sont en général des bactéries de la fermentation malolactique. Pour pouvoir observer le développement de ces bactéries dans le moût, il faudrait pouvoir inhiber le développement des autres microorganismes. Quant aux bactéries de maladies, elles sont vraisemblablement présentes sur les raisins, au même titre que les autres microorganismes, mais elles ne se développent en fait que rarement, lorsque le milieu et les conditions leur deviennent favorables, ce qu'on cherche précisément à éviter grâce aux soins de la vinification et de la conservation.

La présence des bactéries lactiques dans le matériel et le logement vinaires est probable ; on sait le danger de contamination que l'on court en logeant un vin sain dans un fût ou un foudre ayant contenu auparavant du vin altéré. Il est vraisemblable également que dans certains cas une fermentation malolactique peut se déclarer à la suite d'un ensemencement par les récipients vinaires. Mais les mesures de propreté et de stérilisation du matériel de vinification et de conservation, recommandées pour éviter les altérations, s'opposent de la même façon à l'ensemencement par les bactéries malolactiques.

RIBÉREAU-GAYON a reconnu la présence constante de bactéries attaquant l'acide malique et parfois l'acide tartrique dans les sols des caves et des chais.

La présence des bactéries dans les vins jeunes est générale, tout au moins dans les conditions de vinification du Bordelais. Si, avec les soins d'asepsie nécessaires, on met en bouteille bouchée un vin jeune prélevé au sortir de la cuve de fermentation, et si on place cette bouteille à la température de 25°C pendant plusieurs semaines, on constate toujours des développements bactériens, à moins que la vendange (ou le moût) ait subi un très fort sulfitage. Ces observations ont été souvent renouvelées. A la récolte 1957, trente-trois vins différents sont prélevés au sortir de la cuve de fermentation ou en fûts peu de temps après l'écoulage. Une bouteille de chaque vin est pasteurisée aussitôt ; elle servira de témoin et donnera la composition du vin à l'origine. Une autre bouteille est conservée sans modification ; enfin une troisième bouteille est amenée à pH 3,8 par addition de soude. Le prélèvement des échantillons et le bouchage sont faits aseptiquement. Après quelques mois de conservation à 25°C, les vins sont analysés pour juger de l'importance et de la nature des développements bactériens.

Dans la série des vins laissés à leur propre pH, qui variait de 3,00 à 3,55, trois vins seulement sur trente-trois ont conservé leurs acidités totales et volatiles initiales et n'ont pas été le siège de transformations bactériennes. Parmi les autres, la moitié ont présenté une augmentation d'acidité volatile supérieure à 0,2 g par l, sans dépasser toutefois 0,70 g. Un seul vin s'est altéré (acidité volatile 1,19).

Dans la série à pH 3,8, on note sept cas d'altération (acidité volatile de 0,80 à 1,65) et l'augmentation de l'acidité volatile dépasse toujours 0,2 g.

Ces observations démontrent la présence dans tous les vins étudiés des bactéries de la fermentation malolactique ; précisons qu'il s'agissait de vins blancs et rouges de qualité élaborés avec des sulfitages faibles, comme il est de règle dans la région bordelaise. On constate encore la présence des bactéries de maladie, capables d'attaquer l'acide tartrique ou le glycérol, dans 20 p. 100 des vins étudiés.

III. — TESTS DE CLASSIFICATION

La différenciation des bactéries est basée sur des observations microscopiques de forme, de colorations, et sur l'étude des caractères physiologiques. Les tests de production d'acétoïne, d'indol, de réduction des nitrates et de la présence de catalase sont des essais classiques d'identification des bactéries, mais dans le cas des bactéries lactiques ils donnent des résultats négatifs pour les quatre genres *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* qui peuvent intéresser l'œnologie. Cette raison (également valable pour le cidre) a conduit CARR (5) à simplifier le processus d'identification des bactéries, en ne considérant que les tests biochimiques principaux : catalase, fermentation des sucres, fermentation des acides organiques, hétéro- ou homofermentation.

L'examen microscopique permet de séparer les bactéries en deux catégories : coques (forme ronde) et bacilles (forme de bâtonnet). La détermination des caractères physiologiques permet d'identifier le genre et l'espèce.

A. — Fermentation des différents métabolites.

Le test de fermentation des sucres est aussi important pour l'identification des bactéries que pour celle des levures. Un certain nombre de difficultés ont été ren-

contrées dans son exécution : tout d'abord, la recherche d'un milieu de base qui convient à toutes les espèces ; le choix d'un pH également convenable au développement des bactéries et à la stabilité des sucres ; ensuite la fidélité du test et sa reproductibilité qui oblige à répéter les essais ; enfin le morcellement des groupes de bactéries en presque autant de subdivisions que de cas, par conséquent après l'interprétation des résultats, la difficulté de classer ces souches, les classifications existantes ayant été établies dans des conditions différentes et pas toujours précisées.

La bibliographie indique une grande variété de milieux de base : eau peptonée et salée enrichie en sels minéraux par une solution oligo-dynamique (BIDAN, 6) ; bouillon peptoné à l'extrait de bœuf, milieu synthétique de AYERS, RUPP et JOHNSON qui convient si les organismes utilisent les sels d'ammonium comme seule source d'azote ; enfin milieu de CARR : caséine hydrolysée, extrait de levure, sels minéraux à pH 4,8.

Les sucres essayés sont le glucose, le fructose, le maltose, le saccharose, le lactose, le raffinose, l'arabinose, le xylose ; on essaie encore comme substrat le mésoinositol et le glycérol à la dose de 2 p. 100. On pratique de même l'essai de dégradation des acides organiques du raisin : acides tartrique, malique et citrique.

Dans la technique habituelle, l'ensemencement est effectué sur un milieu nutritif contenant une seule des substances à étudier et il y a autant de tubes de culture que de métabolites différents ; le développement des bactéries ou l'absence de développement est noté d'après le trouble obtenu. L'inconvénient de la méthode est que toutes les conditions défavorables, par exemple carence du milieu de base, faible ou lente assimilation de certaines substances, ensemencement insuffisant, se traduisent par un résultat d'assimilation négatif. D'un autre côté, le développement peut n'être pas absolument nul sur le milieu de base sans aucune addition, et le test est alors difficile à interpréter.

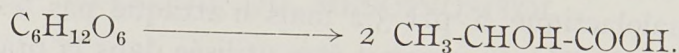
Nous avons adopté la technique d'étude suivante, plus sûre et d'exécution plus aisée. Au même milieu de base, on ajoute à la fois toutes les substances à essayer ; on ensemence un volume assez important de liquide et après le délai suffisant on détecte par l'analyse directe ou par chromatographie sur papier les substances métabolisées et les substances apparues (acide acétique, mannitol, cation ammonium, etc.). Voici la composition, en g par litre, de la solution que nous utilisons et qui est à base du milieu nutritif de CARR :

Caséine hydrolysée	5
Extrait de levure	4
Phosphate acide de potassium	0,55
Chlorure de potassium	0,425
Chlorure de calcium	0,125
Sulfate de magnésium	0,125
Perchlorure de fer	0,0025
Sulfate de manganèse	0,0025
Fructose	4
Maltose	4
Lactose	4
Raffinose	4
Arabinose	4
Xylose	4
Glycérol	3
Mésoinositol	0,5
Acide malique	2
Acide tartrique	2
Acide citrique	1

Le pH du milieu est ajusté à 4,2. Le glucose, quoique moins bien assimilé, se conduit toujours comme le fructose et n'a pas été ajouté à ce milieu, non plus que la saccharose qui risque d'être hydrolysé à la longue. Le milieu de culture est placé en bouteilles, comportant un système de bouchage hermétique avec rondelle de caoutchouc, et stérilisé.

B. — *Hétéro- et homofermentation, pH limites.*

Les microorganismes homofermentatifs convertissent environ 95 p. 100 du glucose ou des autres hexoses attaqués en acide lactique d'après l'équation :



De très petites quantités de gaz carbonique ou d'acides volatils peuvent être également produites. L'acide lactique formé peut être *d*, *l* ou *dl*, mélange des deux formes actives en quantités égales. Ce type de fermentation est caractéristique de l'espèce bactérienne.

Les microorganismes hétérofermentatifs diffèrent des précédents en ce que l'acide lactique n'est qu'un des nombreux produits principaux formés à partir des sucres : on note encore la formation d'alcool éthylique, d'acide acétique, de glycérol, de gaz carbonique, etc.

Pour juger ces caractères, on détermine après dosage le rapport des acidités fixe et volatile formées sur un milieu au glucose après l'incubation suffisante. Si la formation d'acidité fixe est dix fois plus élevée que celle d'acidité volatile, on estime conventionnellement que la bactérie est homofermentative. Dans le cas contraire elle est hétérofermentative.

Pour observer la formation de mannitol à partir du fructose, on ajoute ce sucre à raison de 2 p. 100 dans le milieu de base et on opère après un délai suffisant de culture. Plusieurs procédés de caractérisation peuvent être utilisés. En laissant sécher à l'air quelques cm³ du milieu, dans un verre de montre, le mannitol apparaît cristallisé sous forme d'aiguilles soyeuses ; la caractérisation est plus sensible après une défécation au charbon décolorant. On peut encore utiliser la chromatographie sur papier. La présence de mannitol caractérise une bactérie hétérofermentative.

Comme l'ont fait remarquer LAMBION et MESKHI (7), il y aurait un grand intérêt en vinification à ce que la fermentation malolactique soit conduite par des bactéries strictement homofermentatives. Ces bactéries, beaucoup moins fréquentes que les hétérofermentatives et aussi moins actives, ne forment pas d'acide acétique, ou seulement des quantités très faibles, dans la fermentation des sucres, même à partir du fructose. Mais l'étude de leurs caractères physiologiques montre qu'il est possible d'utiliser également dans la pratique des souches de bactéries classées comme hétérofermentatives, à la condition qu'aux pH des moûts et des vins elles fassent fermenter l'acide malique sans toucher aux sucres. On trouve plus facilement de telles bactéries parmi les coques, qui paraissent être vraiment les microorganismes spécifiques de la fermentation malolactique, que parmi les bacilles.

Nous déterminons les pH limites pour la fermentation des sucres et de l'acide malique, données extrêmement importantes au point de vue pratique pour caractériser une bactérie, de la façon suivante.

Les cultures ont été effectuées sur moût de raisins acides dilué deux fois et enrichi

en substances azotées, en facteurs de croissance et en oligoéléments par addition de 5 g par l d'extrait de levure. On ensemence à divers pH exactement ajustés : 3,0 — 3,2 — 3,4 — 3,6 — 3,8 — 4,0 et 4,2. Après plusieurs semaines à 25°C, on dose dans chaque cas les sucres fermentés, l'acidité volatile formée et on détermine par chromatographie l'acide malique restant.

Le tableau ci-dessous indique quelques types de caractères fermentatifs. On voit que les souches de bactéries se différencient profondément dans leur comportement vis-à-vis des sucres et de l'acide malique. La souche homofermentative n° 7 n'attaque l'acide malique qu'à partir de pH 3,4, mais elle forme très peu d'acidité volatile à pH 4,2. Parmi les bacilles hétérofermentatifs, la bactérie n° 21, qui provoque la fermentation malolactique à pH 3,2 mais n'attaque pas les sucres et ne forme pas d'acide acétique à pH 3,6, pourrait être utilisée dans la pratique entre ces limites de pH ; les autres souches de cette catégorie font fermenter les sucres à des pH bas et n'ont pas d'activité préférentielle vis-à-vis de l'acide malique. Parmi les coques, un plus grand nombre, comme la souche n° 18, pourraient servir dans la préparation de levains malolactiques.

CARACTÈRES FERMENTATIFS DES BACTÉRIES EN FONCTION DU pH

Milieu : moût de raisin dilué de moitié, enrichi par 5 g par l d'extrait de levure

Les teneurs sont exprimées en g par litre.

	N° des souches		pH 3,0	pH 3,2	pH 3,4	pH 3,6	pH 4,2
Bacille homofermentatif	7	Sucre fermenté	4	3	6	6	12
		Acide malique restant	2	2	0	0	0
		Acidité volatile	0,20	0,20	0,20	0,30	0,30
Bacilles hétérofermentatifs	21	Sucre fermenté	5	6	8	9	45
		Acide malique restant	2	0	0	0	0
		Acidité volatile	0,23	0,28	0,28	0,36	3,9
	1	Sucre fermenté	0	0	4	34	57
		Acide malique restant	3	3	3	1,5	0
		Acidité volatile	0,20	0,30	0,60	4,10	7,20
	4	Sucre fermenté	0	40	52	50	55
		Acide malique restant	0	0	0	0	0
		Acidité volatile	0,35	4,7	5,7	6,1	7,1
Coques hétérofermentatifs	18	Sucre fermenté	6	6	9	10	28
		Acide malique restant	0	0	0	0	0
		Acidité volatile	0,30	0,31	0,31	0,32	2,20
	5	Sucre fermenté	0	6	11	23	43
		Acide malique restant	0	0	0	0	0
		Acidité volatile	0,35	1,20	1,70	3,35	5,30

A la suite de nos observations, les souches de bactéries peuvent se caractériser vis-à-vis de leur aptitude à produire une fermentation malolactique pure par deux chiffres, l'un indiquant le pH-seuil d'attaque de l'acide malique, l'autre, le pH-seuil d'attaque des sucres avec formation élevée d'acidité volatile. Plus l'écart est grand

entre ces deux valeurs de pH, et mieux la bactérie est adaptée à la fermentation malolactique dans les vins. Ainsi pour la bactérie n° 18 l'écart entre ces pH remarquables est supérieur à 0,6, tandis qu'il est inférieur à 0,2 pour la bactérie n° 5.

Le fructose de moût de raisin est toujours attaqué par les bactéries plus rapidement que le glucose, quel que soit le pH, et la plupart des bactéries se conduisent de la même façon à ce sujet. Lorsque 40 g par l de sucres réducteurs ont été fermentés, ils se composent approximativement de 10 g de glucose pour 30 g de fructose. Environ 30 p. 100 des souches étudiées ont donné du mannitol à pH 4,2 à partir du fructose.

IV. — ATTAQUE DU MÉSOINOSITOL

Dans un travail sur le dosage microbiologique du mésoinositol dans les vins PEYNAUD et LAFOURCADE (8) avaient observé que les vins rouges peu sulfités, ayant subi la fermentation malolactique, présentent toujours beaucoup moins de mésoinositol que les vins blancs sulfités, qui ont conservé leur acide malique. Le mésoinositol peut même disparaître complètement au cours des attaques bactériennes, toujours dans les vins tournés, mais encore exceptionnellement, dans des vins non altérés. Il est donc certain que les bactéries lactiques font fermenter le mésoinositol. Ces faits n'avaient pas été signalés dans le cas des vins, mais la destruction du mésoinositol est courante dans le métabolisme bactérien, en particulier pour les genres *Lactobacillus* et *Aerobacter* (9, 10, 11).

Aux récoltes 1956 et 1957, nous avons rassemblé de nombreuses observations confirmant la généralité de l'attaque du mésoinositol aux cours de fermentations malolactiques spontanées. Comme il a été déjà indiqué, des vins rouges sont placés en bouteilles au sortir de la cuve de fermentation ; l'une d'elles est pasteurisée ; une autre est conservée au pH du vin ; une troisième est amenée à pH 3,8. Conservées plusieurs semaines à 25°C, ces deux dernières bouteilles sont dans tous les cas, le siège d'une fermentation malolactique et de développements microbiens, contrôlés par l'analyse. On a dosé également le mésoinositol ; le tableau ci-dessous reproduit les résultats pour une dizaine de vins.

ATTAQUE DU MÉSOINOSITOL AU COURS DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

Les acidités sont exprimées en g par l, le mésoinositol en mg
Dosages microbiologiques du mésoinositol effectués par S. LAFON-LAFOURCADE

	pH	Vin pasteurisé			Vin non pasteurisé		
		Acidité totale	Acidité volatile	Mésoinositol	Acidité totale	Acidité volatile	Mésoinositol
1	3,20	4,80	0,21	575	3,63	0,34	575
2	3,25	4,31	0,34	440	3,92	0,52	50
3	3,25	4,61	0,22	503	3,72	0,45	100
4	3,25	5,00	0,36	460	3,72	0,40	460
5	3,22	5,22	0,22	550	3,48	0,36	33
6	3,40	5,13	0,21	400	3,64	0,48	400
7	3,58	5,22	0,31	850	3,92	0,67	35
8	3,26	5,00	0,27	780	3,52	0,35	290
9	3,15	4,98	0,27	750	3,98	0,89	440
10	3,10	5,15	0,18	635	3,82	0,36	6

Pour l'ensemble de nos observations, la teneur en mésoinositol n'a pas varié au pH du vin (pH 3,0 à 3,2) dans trois vins seulement sur vingt-deux, bien qu'il y ait eu développement microbien et disparition de l'acide malique (vin n° 4 du tableau). Par contre le mésoinositol a toujours été attaqué lorsque le vin a été amené à pH 3,8. Il a complètement disparu (teneur restante inférieure à 20 mg par l) dans cinq vins sur vingt-deux à leur propre pH, dans onze vins sur vingt-deux à pH 3,8. Comme pour les autres substances métabolisées par les bactéries, la fermentation du mésoinositol est donc d'autant plus aisée que le pH est plus élevé.

L'attaque du mésoinositol est indépendante de l'état d'altération du vin, c'est-à-dire qu'il n'y a aucun rapport entre l'acidité volatile formée et le mésoinositol disparu. Quand l'acidité volatile formée est élevée, le mésoinositol n'est pas forcément davantage attaqué (vin n° 9), alors qu'il peut disparaître complètement dans un vin d'acidité volatile faible (vin n° 10). On peut conclure que sa fermentation ne conduit vraisemblablement pas à la formation d'acide acétique.

D'autres observations ont montré que le taux du mésoinositol commençait à diminuer, dans la plupart des cas, seulement après la disparition de l'acide malique. C'est pour cette raison qu'il est rare d'observer dans la pratique, où les conditions sont moins favorables à une attaque profonde et prolongée, des diminutions de la teneur en mésoinositol aussi importantes que celles constatées dans cet essai.

V. — NUTRITION AZOTÉE DES BACTÉRIES LACTIQUES

Les besoins des bactéries de la fermentation malolactique en aminoacides ont fait l'objet d'importantes études (12 à 16). D'après ces travaux l'arginine, la cystéine, l'acide glutamique, l'histidine, la leucine, la phénylalanine, la sérine, le tryptophane, la tyrosine ou la valine sont nécessaires à la croissance des bactéries lactiques ; suivant les souches étudiées, l'ensemble de tous ces acides aminés est indispensable ou seulement un groupe de quelques-uns d'entre eux.

Les purines exercent un rôle important ; si l'on prépare un milieu de culture sans adénine, guanine, xanthine et uracile, la croissance est réduite de 20 à 25 p. 100.

Après avoir constaté que l'extrait de levure favorise fortement la croissance des espèces de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc*, LÜTHI et VETSCH (14) ont cherché à séparer les substances activantes que contient cet extrait par précipitation et chromatographie ; les auteurs arrivent à la conclusion qu'il s'agit probablement de substances azotées simples.

L'addition au vin de quelques acides aminés ou mieux de peptone ou de caséine hydrolysée exempte de vitamines montre une nette amélioration de la multiplication bactérienne.

S. LAFON-LAFOURCADE a déterminé la composition azotée des bactéries des espèces *Leuconostoc* et *Lactobacillus*, isolées de vins et développées sur jus de raisin enrichi (azote total : 756 mg par l). Voici la constitution moyenne en acides aminés des protéines de ces bactéries.

On peut rapprocher cette composition de celle des protéines des levures (17). Les bactéries lactiques sont beaucoup plus riches en arginine et lysine que les levures et un peu plus pauvres en α -alanine, acide aspartique et proline ; les différences pour les autres acides aminés sont peu importantes.

	% du poids de protéines
α -Alanine	3,2
Arginine	11,6
Acide aspartique	5,0
Cystine	0,2
Acide glutamique	10,3
Glycocolle	4,8
Histidine	1,2
Isoleucine	6,0
Leucine	5,3
Lysine	12,8
Méthionine	2,2
Phénylalanine	2,3
Proline	2,4
Sérine	4,6
Thréonine	4,6
Tryptophane	0,6
Tyrosine	3,9
Valine	6,0

RIPPEL et OHSKE (18) ont donné les premières études sur la consommation des substances azotées pendant la fermentation malolactique. D'autre part nous avons montré depuis longtemps qu'au cours de ce phénomène les bactéries élèvent le teneur en ammoniacale des vins par désamination (19) ; d'après ARCHINARD et BOUDOT, elles sont même les seules bactéries lactiques à agir de cette façon (20). Dans le tableau ci-dessous nous donnons deux exemples d'évolution des principaux acides aminés au cours de la fermentation malolactique des vins. Certains acides aminés sont toujours consommés, comme l'arginine, d'autres au contraire ont leur teneur augmentée par protéolyse de polypeptides ou de protéines ; les comportements peuvent être d'ailleurs différents d'un vin à un autre (ce qui est le cas ici pour la thréonine).

MODIFICATION DE LA COMPOSITION AZOTÉE DES VINS
PAR FERMENTATION MALOLACTIQUE

Teneurs en mg par l. Analyses de S. LAFON-LAFOURCADE

	Vin rouge		Vin blanc	
	Avant fermentation malolactique	Après fermentation malolactique	Avant fermentation malolactique	Après fermentation malolactique
α - Alanine	9	0	—	—
Argine	24	14	58	14
Cystine	2	3	—	—
Acide glutamique	34	71	34	47
Isoleucine	12	27	16	18
Leucine	6,6	37	18	21
Thréonine	19	100	258	200
Tryptophane	3,7	24	5,2	18
Valine	26	38	30	38
N ammoniacal	7	28	3	17

Un autre tableau indique la modification de composition azotée d'un milieu nutritif sucré par développement de souches de bactéries lactiques appartenant à deux espèces différentes. A part l' α -alanine dont le taux augmente nettement, tous

les acides aminés sont ici consommés et utilisés à la synthèse bactérienne. (On a récolté 1 g environ de bactéries en poids sec par l).

MODIFICATION DE LA COMPOSITION AZOTÉE
D'UN MILIEU DE CULTURE PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

Le milieu de culture est le moût de raisin dilué, enrichi par de l'extrait de levure et ajusté à pH 4,2. Les teneurs sont exprimées en mg par litre.

Analyses de S. LAFON-LAFOURCADE.

	Avant fermentation	Fermenté par <i>Leuconostoc</i>	Fermenté par <i>Lactobacillus</i>
α - Alanine.....	88	110	110
Arginine.....	150	41	41
Acide aspartique.....	110	20	19
Cystine.....	5	3	3
Acide glutamique.....	194	71	73
Glycocolle.....	102	36	35
Histidine.....	20	9	9
Isoleucine.....	130	29	35
Leucine.....	155	46	62
Lysine.....	63	0	0
Méthionine.....	45	16	16
Phénylalanine.....	120	56	32
Proline.....	205	148	148
Sérine.....	124	92	92
Thréonine.....	275	130	130
Trytophane.....	8	4	4
Tyrosine.....	106	35	29
Valine.....	132	40	47
N total.....	756	621	627
N ammoniacal.....	87	78	78

Les problèmes que pose la nutrition azotée des bactéries lactiques ne sont pas complètement résolus. Ils sont cependant essentiels pour la connaissance et la conduite de la fermentation malolactique ; l'énergie nécessaire à la fermentation de l'acide malique pourrait provenir partiellement de la décomposition de substances azotées.

Des observations assez générales montrent que la fermentation malolactique est obtenue toujours plus aisément dans les vins jeunes conservés sur leurs lies de fermentation. Les lies peuvent agir favorablement parce qu'elles contiennent les bactéries nécessaires, mais on peut penser qu'interviennent également des phénomènes d'autolyse des levures, qui cèdent au milieu des substances azotées et des facteurs de croissance. Il a été montré que la stabilité des cidres est en rapport direct avec le taux d'azote, lié lui-même au temps de séjour sur les levures. On sait également que certains produits de l'autolyse levurienne, en particulier les purines et les pyrimidines, constituants de l'acide nucléique des levures, sont des substances essentielles pour la croissance des bactéries lactiques. On a vu expérimentalement que de petites quantités d'extrait de levure activent toujours nettement la fermentation malolactique dans un milieu où elle est difficile.

VI. — POSSIBILITÉ DE PROVOQUER LA FERMENTATION MALOLACTIQUE A L'AIDE DE BACTÉRIES CULTIVÉES

Parfois la fermentation malolactique n'est pas obtenue dans la pratique parce que les conditions favorables ne peuvent être réalisées ; mais il semble que souvent elle se produit mal ou ne se produit pas par insuffisance ou manque de bactéries actives. On observe chaque année, dans une région vinicole comme le Bordelais, des crus privilégiés qui, grâce à une microflore adaptée, subissent la fermentation malolactique très tôt (ainsi généralement les grands crus médocains sont les premiers à se désacidifier), tandis qu'ailleurs elle s'avère difficile et parfois même impossible. Le fait plusieurs fois signalé que la fermentation malolactique se fait plus aisément en grande masse qu'en petit volume, même à conditions égales de température, peut s'expliquer également par la rareté des bactéries et l'irrégularité de l'ensemencement initial.

La question s'est posée de savoir si la fermentation de l'acide malique peut être provoquée par un ensemencement avec des cultures pures de bactéries, de la même façon qu'on provoque la fermentation alcoolique à l'aide de cultures de levures. La première difficulté rencontrée est de préparer des cultures assez abondantes et assez actives. Les ensemencements avec de telles cultures de vins faits ayant de l'acide malique conduisent presque toujours à un échec, les bactéries introduites n'arrivant pas à se développer à partir des constituants de ces vins. Les bactéries qui se multiplient dans un milieu nutritif se sont adaptées exactement aux conditions de composition de ce milieu. Lorsqu'on les place dans un nouveau milieu moins favorable, elle ne peuvent provoquer la fermentation malolactique que par la voie d'une nouvelle adaptation ; cette adaptation est d'autant plus difficile que la composition des deux milieux successifs est plus différente. Ainsi obtient-on surtout de bons résultats à l'aide de larges coupages, par exemple d'un vin riche en acide malique avec 10 à 25 p. 100 d'un autre vin en cours de fermentation malolactique ou venant de subir cette fermentation, ou encore en pratiquant des ensemencements à l'aide des lies de soutirage de ce vin. Dès 1922, FERRÉ (21) avait essayé l'utilisation des lies. Il est possible de conserver l'activité des bactéries malolactiques des lies pendant plusieurs mois en les gardant à basse température au réfrigérateur.

MARQUES GOMES, DA SILVA BABO et GUIMARAIS (22) ont les premiers obtenu des désacidifications de vins à l'aide d'ensemencements massifs par des bactéries cultivées, sans reproduire cependant tout à fait le phénomène naturel ; ils opéraient d'ailleurs sur de petits volumes (20 l) ; les désacidifications obtenues étaient très lentes et se poursuivaient encore sept mois après l'ensemencement.

Nous pensons qu'une des raisons principales des échecs enregistrés dans l'emploi des cultures pures de bactéries, réside dans le fait qu'on a essayé d'ensemencer le vin lui-même, alors que dans les cas de fermentation malolactique naturelle, l'ensemencement intervient sur la vendange ou sur le moût. C'est aussi l'avis de WEBB et INGRAHAM (4). Effectivement, il devient facile d'obtenir la fermentation malolactique au laboratoire, dans un délai assez court, en ensemençant un moût simultanément par des levures et par une culture pure de bactéries (23, 24) ; dans ces conditions la fermentation malolactique commence généralement un peu avant la fin de la fermentation alcoolique et se termine en quelques jours. Les mêmes observations ont été faites dans des essais semi-industriels de vinification où l'ensemencement

des bactéries a été pratiqué sur la vendange. Enfin on a réalisé ainsi la fermentation malolactique de cuves de vins rouges, dans des vignobles où elle intervenait très rarement de manière naturelle.

A. — Préparation des levains.

L'isolement des bactéries se fait à partir de vins ayant subi récemment la fermentation malolactique. La culture pure provenant d'une seule colonie, par conséquent d'une seule cellule, est conservée en tube à essai. Pour préparer de grandes quantités de bactéries, on ensemence avec le contenu d'un tube un litre de milieu, ajusté à pH 4,2, et composé pour moitié de jus de raisin et d'une solution d'extrait de levure à 5 g par l. La croissance est extrêmement rapide dans ce milieu à 30°C. Après quatre à cinq jours d'incubation, il se forme un dépôt abondant de bactéries et ce liquide constitue la culture fraîche utilisable pour les ensemencements dans la pratique ; il contient 100 000 à 200 000 bactéries par mm³.

B. — Exemple d'essais de laboratoire.

Un moût de raisin de 11°4 Baumé, contenant 83 méq d'acide malique par l, est ajusté à divers pH par additions de soude ou d'acide chlorhydrique ; on le place en flacons de fermentation et on stérilise. On ensemence simultanément par *Sacch. ellipsoideus* et par une souche active de bactéries malolactiques en réalisant au départ des populations variées de bactéries, de 10 à 100 000 cellules par cm³ ; on place à l'étuve à 25°C. On suit l'acidité du moût (tableau ci-dessous) et l'acide malique par chromatographie sur papier. La fermentation malolactique est terminée en 15 jours à pH 3,1 et 3,3, c'est-à-dire dès la fin de la fermentation alcoolique avec les ensemencements les plus forts et en 30 jours dans toutes les autres conditions, même à pH 2,9. Ces essais sont facilement reproductibles.

ENSEMENCEMENT SIMULTANÉ D'UN MOÛT DE RAISIN PAR DES LEVURES ET DES BACTÉRIES

Influence du pH et de l'importance de l'ensemencement bactérien
Acidité de titration en g d'acide sulfurique par litre.

Nombre de cellules de bactéries par mm ³	pH	Acidité de titration			
		Moût	Après 11 jours	Après 15 jours	Après 30 jours
100 000	2,9	6,66	6,86	5,44	5,10
	3,1	6,08	5,64	4,12	4,12
	3,3	5,49	4,56	3,43	3,43
1 000	2,9	6,66	7,01	6,76	5,00
	3,1	6,08	6,17	4,31	4,21
	3,3	5,49	5,44	3,53	3,53
10	2,9	6,66	6,86	6,86	5,19
	3,1	6,08	6,42	5,83	4,31
	3,3	5,49	5,68	3,68	3,68

L'ensemencement à l'aide de cultures de bactéries provenant d'une seule cellule se montre au moins aussi efficace que l'ensemencement utilisant l'ensemble des bactéries ayant désacidifié un vin. Cette observation élimine l'hypothèse de l'existence dans les cas habituels d'une symbiose avec un autre microorganisme, qui renforcerait l'action des bactéries malolactiques. Nous avons constaté même que les additions de lies de vin n'ont pas généralement une action aussi rapide et aussi profonde que les additions de bactéries sélectionnées. SUDRAUD et CASSIGNARD citent un exemple où l'ensemencement massif avec des lies, apportant en nombre cinquante fois plus de bactéries qu'un ensemencement avec des cultures pures, s'est montré cependant beaucoup moins actif.

L'avantage que présente l'ensemencement du moût réside dans le fait que ce milieu est beaucoup plus apte que le vin à la multiplication des bactéries. La présence de sucre est un autre argument ; l'endothermie de la réaction malolactique oblige les bactéries à utiliser d'autres substances que l'acide malique, susceptibles de leur fournir l'énergie nécessaire à leur croissance, notamment les sucres. Mais l'attaque des sucres doit rester très limitée sinon l'acidité volatile est élevée. Le succès pratique de l'opération est lié à un commencement de développement en cours de fermentation alcoolique, la multiplication principale et la fermentation malolactique n'intervenant que lorsque le sucre a disparu.

C. — *Applications pratiques.*

Les essais précédents montrent que lesensemencements nécessaires à une fermentation malolactique rapide sont réalisables en vinification. Un litre de levain à 100 000 bactéries par mm^3 ajouté à une cuve contenant 100 hl de vendange réalise une population de départ de 10 000 bactéries par cm^3 , suffisante pour provoquer une fermentation malolactique rapide. Les résultats obtenus au cours d'essais semi-industriels ou pour des vinifications en blanc ou en rouge effectuées en cuves n'ont pas toujours été aussi réguliers que ceux donnés par l'expérimentation au laboratoire, mais ils ont cependant permis d'obtenir plus rapidement la désacidification biologique. En particulier un ensemencement en bactéries après le départ de la fermentation d'une vendange sulfitée à 15 g par hl a rendu la désacidification aussi aisée que dans la vendange non sulfitée. On peut donc bénéficier de cette manière des avantages que donne le sulfitage de la vendange sans craindre les conséquences défavorables de cette opération sur l'évolution de la fermentation malolactique ; il suffit d'attendre qu'après le sulfitage la fermentation alcoolique se soit déclarée, et donc qu'il n'y ait plus d'acide sulfureux libre, pour ajouter les bactéries, par exemple au cours du premier remontage.

En définitive, il semble que l'utilisation dans la pratique de la vinification de levains de bactéries malolactiques soigneusement sélectionnées pour leur activité et leur caractère homofermentatif, c'est-à-dire ne formant pas d'acides volatils à partir des sucres au pH d'utilisation, soit réalisable dans un proche avenir. La difficulté réside précisément dans le choix de telles souches ; elles ne doivent pas toucher aux sucres, notamment au fructose, dans les conditions de pH du moût ou de la vendange. D'autre part, l'importance de l'ensemencement doit être calculé de telle façon que la multiplication des bactéries soit faible tant que la fermentation alcoolique n'est pas terminée et qu'il reste du sucre à transformer dans le milieu.

VII. — ACTION DU LYSOZYME SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES

Visitant le Médoc et assistant dans une propriété à l'opération du collage des vins aux blancs d'œufs, FLEMING, à qui l'on doit les découvertes du lysozyme et de la pénicilline, suggéra que l'efficacité de cette pratique traditionnelle dans la conservation des vins pouvait être due à l'activité antibactérienne du lysozyme du blanc d'œuf. Le lysozyme est une substance naturelle cristallisée provoquant à faible dose la lyse des bactéries, c'est-à-dire la dissolution de la paroi de leurs cellules et par conséquent leur mort. Or le blanc d'œuf contient en moyenne 9 g de lysozyme par litre et les quantités introduites dans le vin par le collage peuvent être de l'ordre de 5 à 8 mg par litre.

Nous avons vérifié qu'effectivement, si le lysozyme cristallisé est sans action sur les levures et les bactéries acétiques, ces doses sont suffisantes pour assurer la destruction de la presque totalité des bactéries lactiques du vin : coques, bâtonnets, filaments, comme le montre le tableau ci-dessous. Les numérations de cellules vivantes sont faites sur boîtes de Pétri à intervalles réguliers après l'incorporation du lysozyme au vin. L'effet maximum sur la destruction des bactéries est obtenu en 24 heures aux pH favorables ; des délais plus prolongés n'améliorent pas l'efficacité. Nous avons précisé d'autre part l'influence du pH et de la température : la proportion de cellules lysées déterminée par la diminution du trouble d'une suspension de bactéries après 24 heures, est maximum à pH 4,5 ; à pH plus bas la lyse est plus lente et moins profonde. C'est à 37°C qu'on observe le maximum d'activité du lysozyme. L'augmentation de la dose de lysozyme incorporée accélère la lyse, mais modifie très peu le nombre des cellules résistantes. En effet, toutes les cellules ne sont jamais complètement détruites et on ne peut obtenir de cette façon la stérilisation bactérienne du vin. Tout se passe comme si un certain nombre de cellules, variable suivant l'espèce et la souche des bactéries, échappait toujours à l'action du lysozyme. Cette proportion est environ d'une cellule sur 9 000 pour le premier vin rouge, d'une cellule sur 210 pour le vin rouge n° 2, d'une cellule sur 1 000 pour le vin blanc.

Mais l'action du lysozyme n'a pu être mise en évidence dans des collages effectués au blanc d'œuf, même à dose très élevée, et la population bactérienne d'un vin n'est pas abaissée davantage après collage au blanc d'œuf qu'avec la gélatine ou la bentonite. On n'observe aucune lyse, ni dans le vin, ni dans le dépôt de colle. Vraisemblablement le lysozyme du blanc d'œuf n'est pas libéré dans le vin au cours du collage et précipite avec l'albumine sous une forme insoluble.

ACTION DU LYSOZYME SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES DU VIN

Nombre de bactéries vivantes par cm³

Doses de lysozyme mg par l.	Vin rouge n° 1 18 000 000		Vin rouge n° 2 520 000		Vin blanc 20 000
	Après 4 h	Après 24 h	Après 4 h	Après 24 h	Après 24 h
4	2 600 000	2 300	490 000	12 000	30
8	1 430 000	2 250	200 000	8 000	10
12	19 700	1 750	4 200	2 400	40
16	15 800	2 000	4 700	2 700	10

VIII. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous avons donné dans ce mémoire quelques résultats de recherches récentes que nous avons conduites sur les bactéries lactiques des vins et leurs rapports surtout avec la fermentation malolactique.

Les techniques d'isolement et les milieux de culture ayant été choisis dans une première série de travaux, nous pensons pouvoir définir et classer les bactéries à l'aide de trois tests principaux : 1^o essais de fermentation de différentes substances, déterminée non pas tube par tube, mais à l'aide d'analyses chimiques et chromatographiques sur un milieu unique contenant toutes les substances à essayer ; 2^o essais d'homo ou d'hétérofermentation du glucose (dans le premier cas l'acide lactique est la principale substance formée ; dans le second cas sont formées également d'autres substances pour une proportion importante) ; 3^o essais de détermination des pH limites ou pH d'arrêt respectivement pour la fermentation de l'acide malique et la fermentation des sucres.

Quelques caractères du métabolisme des bactéries lactiques ont été précisés concernant l'attaque du mésoinositol, propriété courante et non signalée des bactéries malolactiques, et la nutrition azotée directement déterminée par dosage microbiologique des acides aminés.

La possibilité de provoquer dans la pratique la fermentation malolactique des vins à l'aide de l'apport de bactéries cultivées, objectif difficile à atteindre lorsqu'on envisage l'addition des bactéries aux vins faits, a été étudiée sur de nouvelles bases : en ensemençant le moût ou la vendange avant la fermentation alcoolique ou à son début, on réalise assez sûrement la transformation souhaitée.

Enfin nous avons étudié l'action du lysozyme sur les bactéries lactiques des vins. Nous avons observé qu'à très faible dose le lysozyme ajouté à un vin ne laisse que quelques cellules vivantes sur mille ; il agit par digestion de la paroi cellulaire. Le blanc d'œuf est la principale source de lysozyme, mais au cours du collage, tel qu'on le pratique pour la clarification et la stabilisation des grands vins rouges, le lysozyme du blanc d'œuf, pourtant présent à des doses suffisantes à une lyse importante, n'est pas libéré et on n'observe pas la destruction des bactéries ni dans le vin ni dans le dépôt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) RIBÉREAU-GAYON J. — La désacidification biologique des vins. *Soc. Sci. phys. Bordeaux*, p. 23, 1936-37. — Les bactéries du vin. *Soc. Sci. phys. Bordeaux*, p. 57, 1936-37. — Note sur l'action des bactéries dans les vins. *Soc. Sci. phys. Bordeaux*, 1937-38. — La désacidification des vins par les bactéries. *C. R. Acad. Agric.*, **24**, p. 600, 1938. — Les bactéries du vin et les transformations qu'elles produisent. *Bull. Assoc. Chim.*, **55**, p. 601, 1938. *Progr. agric. vitic.*, **111**, 1939. — Note sur l'action des bactéries dans les vins. *Ann. Ferment.*, **6**, p. 228, 1941. — Étude sur les transformations du vin par les bactéries. *Ann. Ferment.*, **7**, p. 21, 1942. — Sur certaines actions bactériennes dans les vins. *Soc. Sci. Phys. Bordeaux*, 20 mars 1945. *Traité d'œnologie*. Librairie Polytechnique Ch. Béranger, Paris et Liège, 1947.
- (2) RADLER F., 1958. Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. Isolierung und charakterisierung von Apfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.*, **30**, p. 64-72.
- (3) OCHS G., 1959. Bacterium gracile als Erreger der Lahmstielkrankheit bei Ertragsreben und Tafeltrauben. *Mitteilungen*, **9**, p. 95.
- (4) WEBB R. B. et INGRAHAM J. L., 1960. Induced malolactic fermentations. *Amer. Journ. Enol. Vitic.*, **2**, p. 59.
- (5) CARR J. G., 1957. Occurrence and activity of some lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries. *Journ. Inst. Brew.*, **63**, p. 436-440.

- (6) BIDAN P., 1956. Sur quelques bactéries isolées de vins en fermentation malolactique. *Ann. Technol. agric.*, **5**, p. 597-617.
- (7) LAMBION R. et MESKHI A., 1957. Les bactéries de la fermentation malolactique. *Rev. Ferm. Ind. alim. (Bruxelles)*, **12**, p. 131-144.
- (8) PEYNAUD E. et LAFOURCADE S., 1955. L'inositol dans les raisins et dans les vins. Son dosage microbiologique. *Ann. Technol. agric.*, **4**, p. 381-396.
- (9) HEWITT J. A. et STEABEN P. B., 1921. Note on the fermentation of inositol. *Biochem. Journ.*, **15**, p. 665.
- (10) KUMAGAWA H., 1922. Über die Zerlegung des meso-Inosits und Glycerins nach Art der wahren Zucker durch den *Bacillus lactis aerogenes*. *Biochem. Zeits.*, **131**, p. 157-160.
- (11) MAGASANIK B., 1951. The pathway of inositol fermentation in *Aerobacter aerogenes*. *Journ. Amer. Chim. Soc.*, **73**, p. 5919.
- (12) LUTHI H. et VETSCH V., 1953. Papierchromatographische Trennung und Bestimmung von Aminosäuren in Traubenmost und Wein. *Deutsch. Weinbau*, **7**, n° 1 et 2.
- (13) LUTHI H., 1958. La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres. *Rev. Ferm. Ind. alim. (Bruxelles)*, **12**, p. 15.
- (14) LUTHI H., et VETSCH U., 1959. Über die wachstumsfördernde Wirkung von Hefeextrakt auf einige Milchsäurebakterien, welche den biologischen Säureabbau in Weinen erzeugen. *Mitt. Geb. Lebensmittel. Hyg.*, **50**, p. 264-275.
- (15) JERCHER D., FLESC P. et BAUER E., 1956. Untersuchungen zum Abbau der L. Apfelsäure durch *Bacterium gracile*. *Ann. der Chemie*, **601**, p. 40-60.
- (16) RADLER F., 1958. Der Nähr- und Wuchsstoffbedarf der Apfelsäure-abbauenden Bakterien. *Archiv Mikrobiol.*, **32**, p. 1-15.
- (17) RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1960. *Traité d'œnologie*. Tome premier, p. 204. Librairie polytechnique Ch. Béranger, Paris.
- (18) RIPPEL K. et OHSKE P., 1942. Bilanz der Stickstoffverbindungen in einem gärenden Most und Jungwein. *Vorrats. Lebensm. Forsch.*, **5**, p. 408.
- (19) RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1938. Bilans de la fermentation malolactique. *Ann. Ferment.*, **4**, p. 559.
- (20) ARCHINARD R. et BOUDET J., 1955. La teneur en ammoniac des vins et sa variation au cours du vieillissement. *Ann. Falsif. Fraudes*, **48**, p. 17.
- (21) FERRÉ L., 1922. Influence de la rétrogradation de l'acide malique sur la composition des vins blancs. *Ann. Science agronom.*, p. 277.
- (22) MARQUES GOMES J. V., DA SILVA BABO M. F. et GUIMARAIS A. F., 1953. L'emploi des bactéries sélectionnées dans la fermentation malolactique du vin. *VII^e Congrès intern. Vigne Vin*, Rome, 1953. *Bull. intern. Vin*, n° 299, p. 349.
- (23) PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1959. Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification à l'aide de bactéries cultivées. *C. R. Acad. Agric.*, **45**, p. 355.
- (24) DOMERCQ S., SUDRAUD P. et CASSIGNARD R., 1959. Sur la possibilité d'obtenir rapidement la fermentation malolactique des vins. *84^e Congrès des Sociétés savantes*, Dijon.

ÉTAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR QUELQUES ACTIONS BACTÉRIENNES DANS LES VINS

J. CARLES, Marie LAMAZOU-BETBEDER et Renée PECH.
Laboratoire de Physiologie végétale de l'Institut catholique, Toulouse
Station d'Agronomie et d'Œnologie, Toulouse.

PLAN DU MÉMOIRE

- I. — MODIFICATIONS D'ORIGINE MICROBIENNE.
Les changements apportés par les levures.
L'action des bactéries.
- II. — L'ACTIVITÉ DÉCARBOXYLANTE.
L'acide malique.
Les autres acides organiques.
Les acides aminés.
- III. — LA DÉGRADATION DES ANTHOCYANES.
Les résidus de la biosynthèse.
La dégradation du malvidoside
- IV. — CONCLUSIONS.
- V. — BIBLIOGRAPHIE.

I. — MODIFICATIONS D'ORIGINE MICROBIENNE

Avec les travaux de MÜLLER-THURGAU et OSTERWALDER (1) la découverte de la fermentation malolactique a montré que les bactéries ont parfois une action bien-faisante et l'appréciation sur leur rôle dans l'évolution du vin a changé. On ne saurait nier que de nombreuses bactéries soient nuisibles, mais beaucoup d'autres sont intéressantes et nous leur devons en grande partie certaines qualités des vins vieux.

Le développement des bactéries dans le vin n'est jamais massif comme celui des levures, et, lorsque celles-ci, lors de la fermentation alcoolique, se multiplient et progressent à une prodigieuse vitesse, les bactéries et leur action passent complètement inaperçues. Deux périodes inégales peuvent être ainsi distinguées dans la vie du vin, celle de la fermentation rapide et tumultueuse avec les levures, et celle

du vieillissement, lente et progressive, avec les bactéries. En simplifiant un peu, nous pouvons dire qu'après les levures, les bactéries entrent en action.

Les changements apportés par les levures.

La modification essentielle provoquée par les levures au cours de la fermentation est la disparition des glucides et l'apparition de l'alcool : le moût est transformé en vin nouveau.

A côté de cette action, trop connue pour que nous insistions, il convient de signaler les modifications concernant les acides organiques si abondants dans le vin.

Le cycle citrique fonctionne dans le raisin, et, à côté de l'acide tartrique toujours abondant, ce sont les deux acides, initial et surtout final du cycle, l'acide citrique et l'acide malique qui prédominent dans le moût.

Pendant la fermentation, le cycle succinique surtout paraît fonctionner, et ce sont les deux acides, l'initial et surtout le final, l'acide succinique et l'acide acétique, qui deviennent très abondants.

Ainsi donc, dans le vin nouveau cinq acides organiques sont importants, tous avec un nombre pair d'atomes de carbone : l'acide citrique avec six, l'acide malique, l'acide succinique et l'acide tartrique avec quatre et l'acide acétique avec deux. Dans les deux cycles qui les forment, seuls les acides à six et quatre ou bien à quatre et deux atomes de carbone sont stables. La situation va changer avec les bactéries.

Avec l'alcool et les acides organiques, de nombreux autres corps sont présents dans le vin nouveau, que la fermentation a plus ou moins respectés, les anthocyanes et les flavonoïdes, les acides aminés, etc.

Dans ce milieu complexe vont se multiplier les bactéries ; elles se procureront l'énergie nécessaire à leur vie aux dépens des molécules chimiques qu'elles trouveront à leur disposition.

L'action des bactéries.

Il n'est évidemment pas possible de déceler toutes les modifications chimiques produites dans le vin par les bactéries, car les bactéries sont très diverses et leur action polymorphe, alors que les termes de passage ou de dégradation sont en nombre limité et susceptibles de se former par de multiples voies. Comment savoir par exemple si l'acide acétique provient de la β -oxydation, du cycle succinique, de l'oxydation de l'alcool éthylique, ou d'ailleurs ?

Certains corps cependant apparaissent pendant le vieillissement, dont on devine facilement l'origine : l'acide gallique est de ce nombre et son accumulation nous apporte quelques lumières sur la dégradation très connue du groupe important des anthocyanes et des flavonoïdes.

De ce nombre est aussi l'acide lactique dont le mode d'apparition nous montre à l'œuvre un des moyens les plus utilisés par les bactéries pour dégrader les molécules organiques, la décarboxylation.

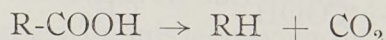
De multiples autres moyens sont employés par les bactéries pour satisfaire, aux dépens des molécules organiques du vin, leurs besoins énergétiques et leurs besoins nutritifs. Elles arrivent à dégrader à peu près n'importe quelle molécule, avec plus ou moins de facilité cependant, et les produits accumulés démontrent l'existence d'un passage plus difficile pour elles, d'un « goulot d'étranglement » dans cette uni-

verselle dégradation : l'acide gallique par exemple témoigne de la difficulté qu'éprouvent les bactéries pour attaquer le noyau benzénique.

Puisqu'il est impossible de considérer en détail toutes ces possibilités d'action, nous ne retiendrons ici que les activités décarboxylantes auxquelles nous introduit l'acide lactique et la dégradation des anthocyanes à laquelle nous introduit l'acide gallique.

II. — L'ACTIVITÉ DÉCARBOXYLANTE

La décarboxylation consiste à décrocher d'une chaîne carbonée une fonction carboxylique : cet atome de carbone était déjà oxydé sur trois valences ; il est alors oxydé sur la quatrième et devient gaz carbonique en perdant le peu d'énergie potentielle qu'il possédait encore



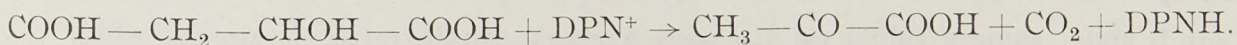
L'acide malique.

Le type de cette action décarboxylante est la fermentation malolactique qui a suscité de nombreuses études tant biologiques que biochimiques.

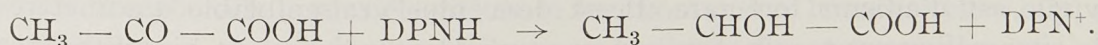
Du point de vue biologique, nos connaissances ne sont pas encore très avancées. Isolées déjà en 1906 par MÜLLER-THURGAU ces bactéries ont été récemment étudiées par BIDAN (2) à partir des vins d'Alsace, du Muscadet et du Gaillac. Elles appartiennent aux trois groupes de Lactobacilles, des Leuconostocs et des Pédicocques : la plus connue de ces bactéries est le *Lactobacillus arabinosus*.

Leur culture réalisée d'abord sur milieu synthétique, s'est révélée beaucoup plus difficile lorsqu'on a voulu ensemer des vins. Parmi les facteurs indispensables à leur croissance, les principaux paraissent être les glucides, les acides aminés et un certain nombre de vitamines (riboflavine, acide pantothénique, acide nicotinique, etc). Parmi les facteurs d'inhibition, le plus important est l'anhydride sulfureux, mais aussi certaines substances polyphénoliques ou même l'alcool dès qu'il atteint une certaine concentration. Sont très importantes aussi les conditions physiques ou chimiques, telles que la température, le pH, le rH, etc. (3 et 4). Il reste encore trop d'inconnus pour que nous puissions produire à volonté cette fermentation dont les œnologues disent qu'elle est « capricieuse ».

Du point de vue biochimique, les travaux sont très nombreux. Avec le *Lactobacillus arabinosus*, l'oxydation de l'acide malique se fait pour Ochoa grâce à l'intervention de l'enzyme malique et du diphosphopyridine-nucléotide qui, pendant la décarboxylation du carbone terminal, prend deux atomes d'hydrogène au carbone et fait apparaître l'acide pyruvique



Cette β -oxydation ne se poursuit pas et régresse même par suite de l'intervention du DPN réduit qui, avec la déshydrogénase lactique, rapporte l'hydrogène emporté lors de l'oxydation, et nous aboutissons ainsi à l'acide lactique (5).

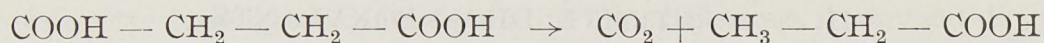


Cette réaction dont on a retrouvé les enzymes dans le *Lactobacillus arabinosus*, est catalysée par le manganèse ou le cobalt et stimulée par le potassium. Cependant,

d'après les travaux de RUTTER et LARDY, les réactions seraient un peu moins complexes et il ne s'agirait peut-être que d'une seule enzyme (6).

Les autres acides organiques.

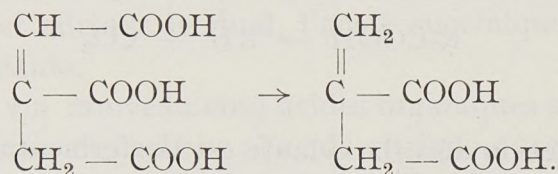
Il existe beaucoup d'autres moyens de décarboxyler un acide organique et l'on a mis en évidence, dans les bactéries surtout, des enzymes capables de décarboxyler sans intermédiaire l'acide succinique en acide propionique (7).



l'acide malonique en acide acétique (8)

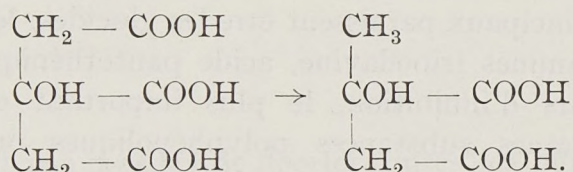


l'acide *cis*-aconitique en acide itaconique (9).



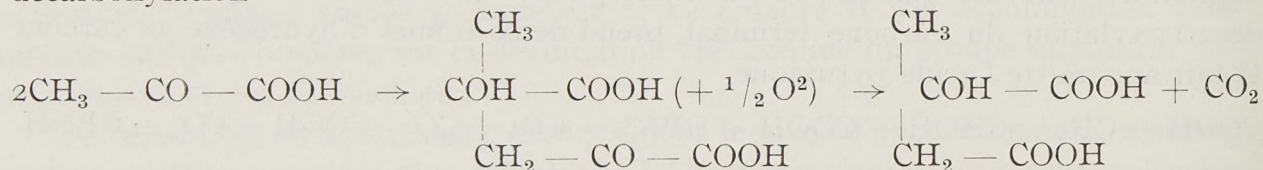
Pour ces réactions sont requis à des titres divers, des corps tels que l'adénosine-triphosphorique, la coenzyme A, le magnésium, etc. (10).

Ainsi donc, en présence des bactéries, de multiples décarboxylations peuvent s'effectuer aux dépens des acides organiques du vin, et c'est ici qu'il convient de parler de celle qui paraît se faire aux dépens de l'acide citrique au cours de cette réaction parallèle à la « fermentation malolactique » que nous avons appelée « fermentation citramalique » (11).



Le processus par lequel se ferait cette décarboxylation n'a pas été élucidé et les diastases n'en ont pas été isolées : ce schème reste pourtant vraisemblable.

Il convient cependant de rappeler qu'un champignon, le *Neurospora crassa*, est susceptible de fabriquer de l'acide citramalique lors des processus de synthèse de la valine, à la suite de l'union de deux molécules d'acide pyruvique suivie d'une décarboxylation



mais il s'agit là de la déviation d'un actif processus de biosynthèse de la valine, dont le fonctionnement paraît invraisemblable dans un milieu tel que le vin, où l'acide pyruvique est d'ailleurs fort rare. Il est donc plus vraisemblable d'admettre que l'acide citramalique apparaît, non pas au cours d'un processus de biosynthèse, mais au cours d'un processus de dégradation.

Ces perspectives nous permettent désormais d'esquisser les grandes lignes de l'évo-

lution des principaux acides organiques du vin, sans tenir compte, bien entendu, de ceux qui sont moins importants et de ceux que nous retrouverons plus loin.

Du raisin proviennent, nous l'avons vu, avec l'acide tartrique, le premier et surtout le dernier stade du cycle citrique, l'acide citrique et l'acide malique ; de la fermentation alcoolique provient le premier et surtout le dernier stade du cycle succinique, l'acide succinique et l'acide acétique. Lorsque ces cycles cessent de fonctionner, par suite sans doute de la disparition de l'équipement diastasique, les acides organiques à nombre de carbone pair sont encore pratiquement seuls dans le vin.

L'acide malique disparaît par décarboxylation et transformation en acide lactique. Cette transformation a lieu parfois vers la fin de la fermentation alcoolique, au cours de l'hiver ou du printemps suivant, mais il est des vins de plusieurs années qui conservent encore leur acide malique.

L'acide citrique persiste ordinairement plus longtemps que l'acide malique. Tandis que celui-ci intervient encore dans le cycle succinique, l'acide citrique n'est plus qu'un organe témoin de son cycle disparu depuis le broyage du raisin. Ce corps devient dès lors une proie offerte aux bactéries qui lui font subir le même sort qu'à l'acide malique, et nous voyons apparaître ainsi un second acide organique impair, à 5 atomes de carbone, l'acide citramalique. L'importance de cette transformation est moins grande pour le vin que celle de l'acide malique, puisque celui-ci était dans le moût 5 à 10 fois plus abondant que l'acide citrique.

Le vin vieux possède ainsi 5 acides organiques principaux, comme le vin nouveau, tandis que le moût n'en possédait guère que trois. Voici, par exemple, pour des vins de Villaudric, les analyses d'un moût et de deux vins d'un an et de 30 ans.

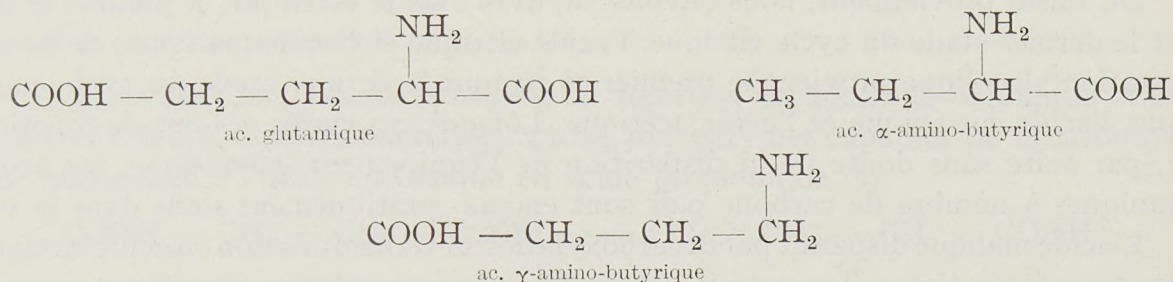
acides en méq/litre	moût	1 an	30 ans
—	—	—	—
ac. tartrique	95	35	12
ac. malique	55	38	
ac. citrique	6	4	
ac. succinique	+	12	11
ac. acétique		15	20
ac. lactique		7	27
ac. citramalique.....		0,5	2

Bien qu'une importante partie de l'acide tartrique disparaisse, surtout par précipitation, cet acide subsiste toujours, en compagnie de l'acide succinique et de l'acide acétique apparus lors de la fermentation alcoolique, tandis que les deux pivots du cycle citrique disparaissent par décarboxylation, remplacés par l'acide lactique et l'acide citramalique dont les proportions rappellent plus ou moins celles de l'acide malique et de l'acide citrique.

Les acides aminés.

Cette activité décarboxylante s'exerce aussi sur les acides aminés, mais d'une façon légèrement différente, comme vont nous le montrer les diacides tels que l'acide glutamique. Pour retrouver en effet sur l'acide glutamique les mêmes conditions que sur l'acide malique, un carboxyle fixé sur un $-CH_2-$, la décarboxylation devrait porter sur le carboxyle le plus éloigné de la fonction amine, le carboxyle ω . Or, cette ω -décarboxylation ne paraît pas facile pour les bactéries et nous n'avons jamais trouvé d'acide α -amino-butyrique dans le vin, pas plus que dans les sols (3), tandis que nous avons trouvé en abondance, aussi bien dans les sols que dans les vins, de

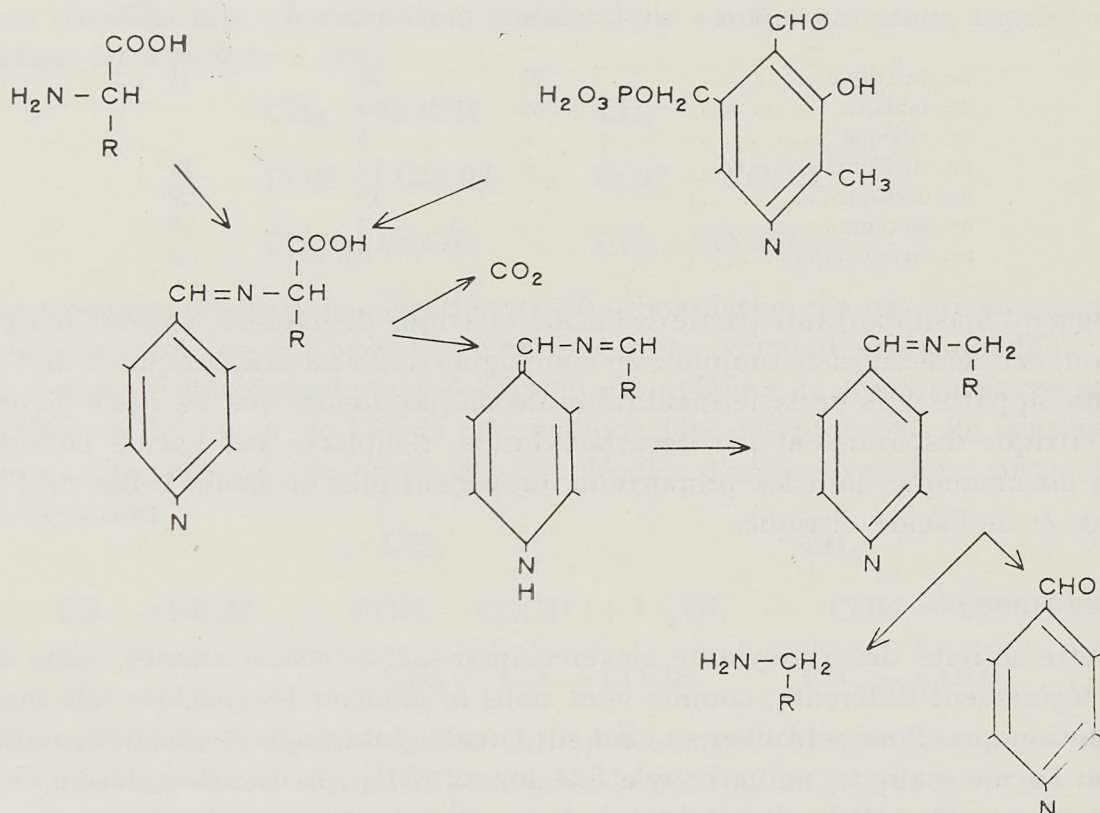
l'acide γ -amino-butyrique, c'est-à-dire le résultat de la disparition du carboxyle voisin de la fonction amine



Ceci montre que les bactéries attaquant les acides aminés sont mieux équipées pour attaquer, non le carboxyle spécial aux diacides, mais celui par lequel ces diacides ressemblent aux autres acides aminés.

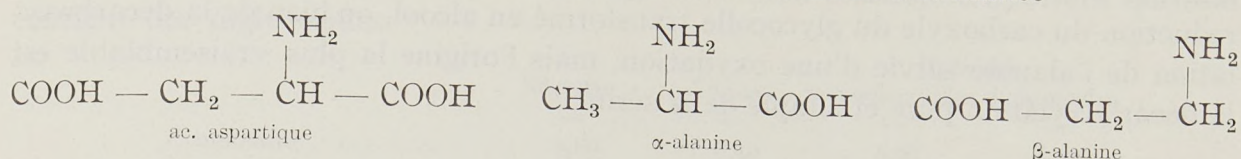
Et ceci confirme l'hypothèse qu'il n'existe pour les acides aminés qu'un seul type de décarboxylase, et qui attaque le carboxyle voisin de la fonction amine. Une coenzyme est spécialisée pour cette attaque, le pyridoxal-phosphate.

L'amine de l'acide aminé se fixe sur la fonction aldéhydique de cette coenzyme en formant, avec perte d'une molécule d'eau, une oxaldine ou base de Schiff. Le carbone porteur de l'amine et du carboxyle laisse celui-ci se décrocher en reportant momentanément sur l'azote la valence laissée libre par son départ. Un atome d'hydrogène vient occuper cette valence, tandis que par fixation d'une molécule d'eau l'oxaldine libère le pyridoxal-phosphate et une amine (14).

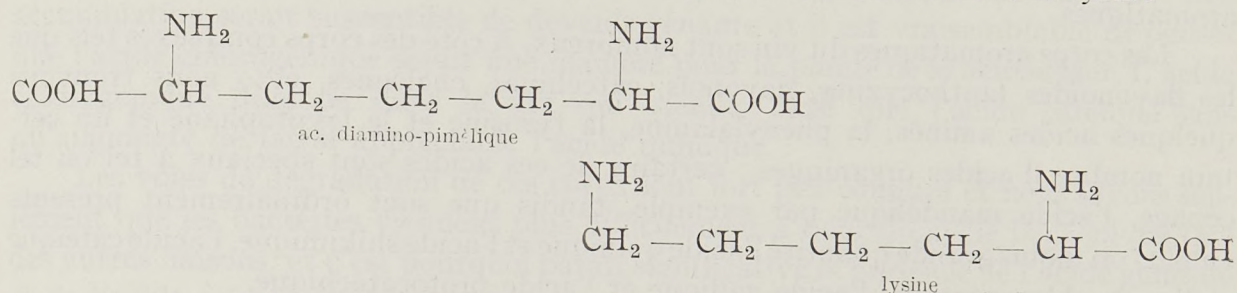


Ce schème d'attaque des acides aminés nous invite à penser que la décarboxylation de l'autre diacide, l'acide aspartique, donne naissance, non pas à l' α -alanine

ordinairement très abondante, mais qui se trouve sans doute sur les voies de la synthèse, mais à la β -alanine toujours présente et relativement abondante

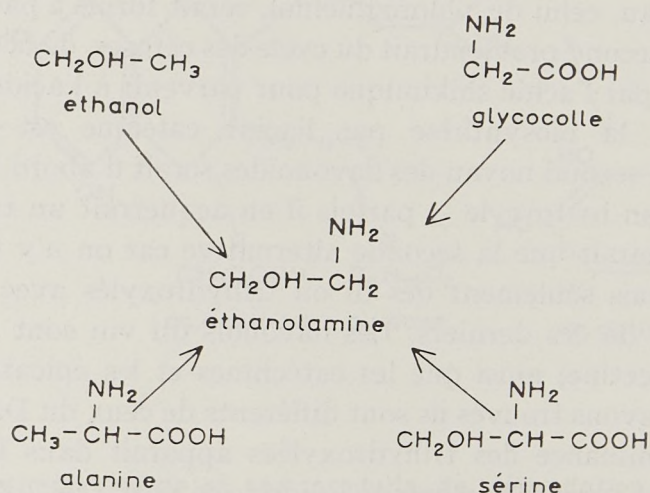


Un autre diacide paraît être décarboxylé par les bactéries, non plus un acide du vin, mais un acide aminé qui entre dans leur constitution et serait décarboxylé, soit pendant la vie du microbe dont ce serait un produit de déchet, soit lorsque, par suite de son autolyse, ses constituants se dispersent dans le vin : il s'agirait de l'acide diamino-pimélique qui, par perte d'un carboxyle, donne naissance à la lysine



L'abondance de la lysine après la fermentation témoignerait de l'activité bactérienne, comme en témoigne sous un autre aspect la disparition des acides aminés riches en amines tels que l'arginine et la multiplication de ceux qui, comme la proline ont un atome d'azote difficilement accessible. La lysine serait ainsi un déchet des bactéries, peut-être aussi des levures, tandis que l'arginine serait l'aliment azoté préféré, beaucoup plus facilement utilisable que la proline, et c'est pourquoi l'arginine diminue tandis qu'augmentent la lysine et la proline (15).

Alors que les diacides, après une décarboxylation, sont encore des acides aminés, il n'en est plus de même pour les mono-acides. Après la disparition de leur unique fonction acide, ils s'évadent du groupe des acides aminés, se révèlent ordinairement assez mal avec la ninhydrine et deviennent de ce fait difficilement décelables. L'éthanolamine $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ fait exception, qui se révèle fort bien avec la ninhydrine, et qui se situe sur les chromatogrammes dans la zone où se groupent tous les décarboxylés, au-delà de la β -alanine pour le phénol, en deçà de l'acide γ -amino-butyrique pour le butanol acide.



L'éthanolamine pourrait avoir de multiples origines. Elle pourrait résulter de la fixation d'une fonction amine par une molécule d'alcool éthylique, ou bien de la réduction du carboxyle du glycolle transformé en alcool, ou bien de la décarboxylation de l'alanine suivie d'une oxydation, mais l'origine la plus vraisemblable est la décarboxylation pure et simple de la sérine.

III. — LA DÉGRADATION DES ANTHOCYANES

Les anthocyanes et les flavonoïdes, parce qu'ils sont constitués par deux noyaux benzéniques unis par un hétérocycle, posent le problème de la biochimie des corps aromatiques.

Les corps aromatiques du vin sont nombreux. A côté des corps complexes tels que les flavonoïdes (anthocyanes, flavonols, catéchines, chalcones, etc.) nous trouvons quelques acides aminés, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane et un certain nombre d'acides organiques : certains de ces acides sont spéciaux à tel ou tel cépage, l'acide mandélique par exemple, tandis que sont ordinairement présents en plus ou moins grande quantité l'acide quinique et l'acide shikimique, l'acide caféique et l'acide chlorogénique, l'acide gallique et l'acide protocatéchique.

L'acide quinique est toujours présent, aussi bien dans les moûts que dans les vins vieux, tandis que l'acide shikimique ne se trouve que dans les moûts ou dans les vins très jeunes. L'acide gallique et l'acide protocatéchique n'apparaissent que petit à petit dans le vin, mais l'acide gallique est toujours plus abondant. L'acide chlorogénique et l'acide caféique sont présents dans le raisin et le vin, mais ils diminuent tous les deux au cours du vieillissement.

Les résidus de la biosynthèse.

Bien que la synthèse des anthocyanes se fasse dans le raisin, il subsiste dans le vin un certain nombre de corps intervenant dans cette synthèse, et qui ne sont pas les mêmes toujours que ceux de la dégradation.

La présence de l'acide shikimique uniquement dans les raisins ou les vins jeunes paraît indiquer l'intervention de cet acide dans la seule biosynthèse ; et ceci confirme les hypothèses admises sur la formation des corps aromatiques, et des anthocyanes en particulier.

Le premier noyau, celui du phloroglucinol, serait formé à partir de trois acétates actifs, tandis que le second proviendrait du cycle des cétooses, de la cyclisation de l'heptulose qui passerait par l'acide shikimique pour parvenir à l'acide caféique (16).

Le passage de la biosynthèse par l'acide caféique est vraisemblable, car, d'après GEISSMAN le second noyau des flavonoïdes serait d'abord hydroxylé en 3 et 4 ; parfois il perdrait son hydroxyle 3, parfois il en acquerrait un troisième en 5. Dans le raisin ne se produirait que la seconde alternative car on n'y trouve pas de corps monohydroxylés, mais seulement des di ou trihydroxylés avec ordinairement une large prédominance de ces derniers. Les flavonols du vin sont di ou trihydroxylés (quercétine et myricétine) ainsi que les catéchines et les épicatechines ; quant aux chalcones que nous avons trouvés ils sont différents de ceux du Dahlia qui sont monohydroxylés. La dominance des trihydroxylées apparaît dans les anthocyanes des vins rouges qui, tant parmi les monoglucosides que parmi les diglucosides, représen-

tent 70 à 90 % du total, comme nous le montrent ces dosages d'anthocyanosides dans le vin de deux cépages de *Vitis vinifera* et d'un mélange d'hybrides qui seul contient des diglucosides.

	Négrette	Tannat	Hybrides	
			monoglucosides	diglucosides
Cyanidoside	5,80	6,40	3,00	3,50
Pœonidoside	1,90	2,80	2,80	0,70
Delphinidoside	10,00	15,20	9,10	4,50
Pétunidoside	10,10	10,50	9,90	5,90
Malvidoside	72,10	65,10	40,10	20,50

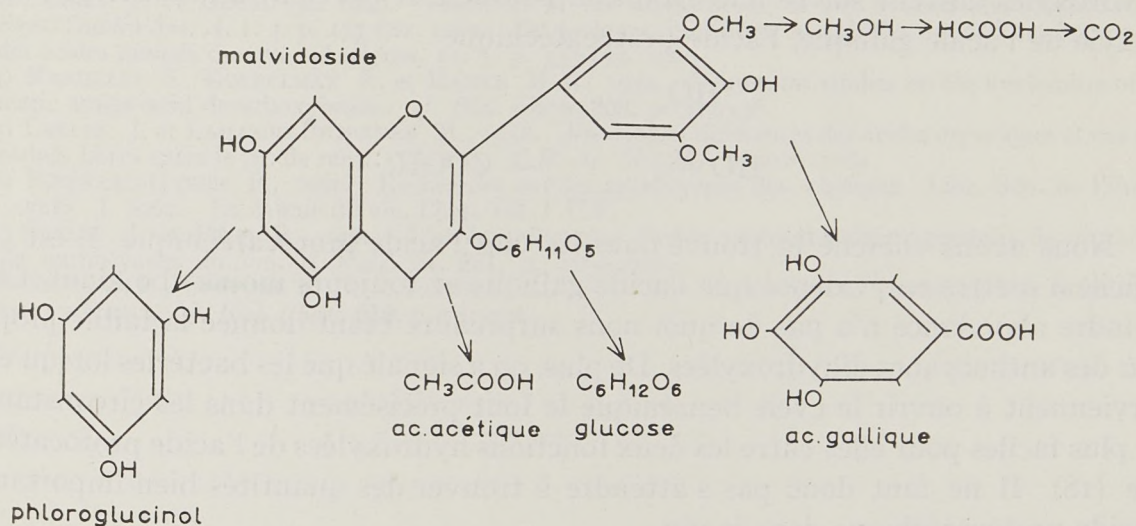
Le rôle de l'acide quinique est plus problématique. Il est possible qu'il soit une voie de garage plutôt qu'une étape dans la synthèse des cycles aromatiques. Son accumulation serait susceptible de devenir gênante et il est vraisemblable de penser que l'acide chlorogénique serait une manière pour la plante de le neutraliser. L'acide chlorogénique diminue dans le vin qui vieillit, ainsi que l'acide caféique sans qu'augmente de façon appréciable l'acide quinique.

Les voies de dégradation de ces corps sont fort peu connues et nous savons seulement que les bactéries viennent plus difficilement à bout du cycle benzénique que des autres liaisons, et c'est pourquoi paraît significative la présence de l'acide gallique et de l'acide protocatéchique (17).

La dégradation du malvidoside.

Pour envisager l'ensemble des problèmes posés, considérons le sort du plus abondant des colorants du vin rouge, le malvidoside. Il représente souvent à lui seul plus de la moitié des anthocyanes. Comme les autres anthocyanes il est uni avec une ou deux molécules de glucose, mais il en diffère par le fait que 2 des 3 hydroxyles de son second noyau portent une fonction méthyle.

Le premier stade de la dégradation paraît être le décrochage du glucose dont il n'est pas invraisemblable de penser qu'une petite partie pourrait être ainsi déjà à la disposition des levures lors de la fermentation alcoolique. Le malvidoside perd de sa solubilité dans l'eau en devenant malvidol, mais l'apparition de l'alcool lui permet de rester en solution.



Le malvidoside et ses produits de dégradation

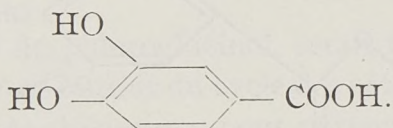
Les deux radicaux méthoxyle peuvent être purement et simplement détachés par une hydrolyse qui les laisse oxydés sur une seule valence et donne de l'alcool méthylique. Il peut être oxydé davantage et parvenir soit avec trois valences oxydées à l'acide formique, soit par l'oxydation totale au gaz carbonique. Dans le vin existe une trop grande abondance de gaz carbonique, et même d'alcool méthylique ou d'acide formique pour que nous puissions déceler ce qui provient des anthocyanes.

L'hétérocycle unissant les deux noyaux benzéniques paraît relativement fragile par son pont oxydique : son hydrolyse fait apparaître une chaîne à trois atomes de carbone unissant les deux noyaux aromatiques. Il est probable qu'alors la cassure se fait à l'endroit où, lors de la biosynthèse, s'est faite la soudure et que nous obtenons d'un côté le phloroglucinol et de l'autre un acide trihydroxycinnamique, à moins que le décrochage des fonctions méthyle ne soit pas encore accompli car alors ce serait l'acide sinapique. Nous n'avons pu mettre en évidence dans le vin ni l'acide sinapique ni l'acide trihydroxycinnamique : ce stade doit donc être bref.

Ici vraisemblablement intervient la β -oxydation que les bactéries utilisent avec tant de facilité, et la chaîne tricarbonée est amputée de deux éléments pour donner naissance à une molécule d'acide acétique et à une autre d'acide gallique ; si la déméthylation n'était pas encore faite, ce serait au lieu de l'acide gallique de l'acide syringique, mais le fait que nous n'avons pu mettre en évidence ni l'acide sinapique ni l'acide syringique semble indiquer que la disparition des fonctions méthoxyle est rapide.

En revanche, l'acide gallique s'accumule dans le vin avec les années, et ceci nous montre que les bactéries ont difficilement prise sur cet acide. N'est-ce pas un fait bien connu que les dérivés phénoliques augmentent en présence des bactéries comme nous l'avons remarqué dans les sols (13). Il est bien évident d'ailleurs que l'acide gallique n'est pas le point d'aboutissement ou plus exactement le palier stable dans la dégradation du seul malvidoside : tous les autres flavonoïdes trihydroxylés, aussi bien le pétunidol et le delphinidol que le myricétol ou même les catéchines doivent normalement passer par ce stade, et c'est pourquoi nous trouvons aussi de l'acide gallique dans les vins blancs.

Si cette hypothèse est exacte, il est à croire que les anthocyanes et flavonoïdes dihydroxylés doivent suivre une évolution parallèle et parvenir à l'homologue dihydroxylé de l'acide gallique, l'acide protocatéchique



Nous avons cherché et trouvé dans les vins l'acide protocatéchique. Il est plus difficile à mettre en évidence que l'acide gallique et toujours moins abondant. Cette moindre abondance n'a pas de quoi nous surprendre étant donnée la faible proportion des anthocyanes dihydroxylés. De plus, on a signalé que les bactéries lorsqu'elles parviennent à ouvrir le cycle benzénique le font précisément dans les circonstances les plus faciles pour elles entre les deux fonctions hydroxylées de l'acide protocatéchique (18). Il ne faut donc pas s'attendre à trouver des quantités bien importantes d'acide protocatéchique dans le vin.

Ainsi, parmi tous les stades de dégradation du malvidoside ou des flavonoïdes du vin, avec peut-être le phloroglucinol dont nous ne nous sommes pas occupés, l'acide

gallique et l'acide protocatéchique seraient seuls susceptibles d'être repérés, et leur mise en évidence confirme la vraisemblance du schème de dégradation que nous avons présenté.

IV. — CONCLUSIONS

Il semble donc que le travail des bactéries dans le vin, bien qu'il soit très lent quand on le compare à celui des levures, est très efficace et dégrade petit à petit de nombreux composés organiques. La décarboxylation en est la voie la plus générale et la mieux connue ; cependant, la variété des moyens d'action mis en œuvre apparaît dans la lente et progressive désagrégation des flavonoïdes qui parvient avec l'acide gallique à un palier difficile à franchir.

Cette action des bactéries, calme, persévérante et diverse, est sans doute l'un des éléments les plus importants du vieillissement des vins.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) MÜLLER-THURGAU H., et OSTERWALDER A., 1913. Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderung. *Zbl. Bakt.* II. Abt, **36** p. 129-338.
- (2) BIDAN P., 1956. Sur quelques bactéries isolées des vins en fermentation malolactique. *Ann. Techn. Agric.*, p. 597.
- (3) LAMAZOU-BETBEDER M. et PECH R., 1956. La fermentation malolactique et l'assouplissement des vins de la récolte 1954. *Vignes et Vins*, 45. p. 2.
- (4) DUPUY M., 1959. Les germes de la fermentation malolactique. *Vignes et Vins*, **80**, p. 35-37.
- (5) KORKES S. et OCHOA S., 1948. Adaptative conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.* **176**, p. 462-464.
- (6) RUTTER W.J. et LARDY H. A., 1958. Purification and properties of pigeon liver malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **233**, p. 374-382.
- (7) DELWICHE E. A., 1948. Mechanism of propionic acid formation by *Propionibacterium pentosaceum*. *J. Bacter.* **58**, p. 811-820.
- (8) GRAY C. T., 1952. The malonic decarboxylase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacter.* **36**, p. 813-820.
- (9) BENTLEY R. et THIESSEN C. P., 1955. Cis-aconitic decarboxylase. *Science, Lancaster*, **122**, 330.
- (10) HAYAISHI O., 1955. Enzymatic decarboxylation of malonic acid. *J. of Biol. Chem.*, **215**, p. 125-136.
- (11) CARLES J., LAMAZOU-BETBEDER M. et PECH R., 1958. Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vin. *C.R. Ac. Sc.* **246**, p. 2160-62.
- (12) WILSON C. D. et ADELBERG E. A., 1957. The biosynthesis of isoleucine and valine. IV. Accumulation of citramalic and dimethylmalic acids by a *Neurospora* mutant. *J. biol. Chem.*, **229**, p. 1011-1018.
- (13) CARLES J. et DECAU J., 1960. Variation in the amino-acids of soil hydrolysates. *Scient. Proc. of Royal Dublin Soc. A.* 1. 4. p. 177-182. 1960. De quelques conditions susceptibles de modifier la proportion des acides aminés du sol. *A. Agron.* 11. 5. p. 557-575. 1960.
- (14) MANDELES S., KOPPELMAN R. et HANKE M. E., 1954. Deuterium studies on the mechanism of enzymatic amino-acid decarboxylation. *J. Biol. Chem.* **209**, p. 327-336.
- (15) CARLES J. et LAMAZOU-BETBEDER M., 1958. Principales différences des acides organiques et des acides aminés libres entre le jus de raisin et le vin. *C.R. Ac. Sc.*, **247**, p. 2181-2184.
- (16) RIBÉREAU-GAYON P., 1960. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. *Libr. Gén. de l'Enseign.* CARLES J. 1960. La chimie du vin. Chap. III. P.U.F.
- (17) CARLES J. et PECH R., 1960. L'acide gallique et l'acide protocatéchique, produits de dégradation des anthocyanes du vin. *C.R. Ac. Sc.* **251**, p. 2764-2766.
- (18) GROSS S. R., GAFFORD R. D. et TATUM E. L., 1956. The metabolism of protocatechuic acid by *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **219**, p. 781-796.

LES ACIDES POLYINSATURÉS DU BEURRE

INFLUENCE DE LA SAISON

Simone KUZDZAL-SAVOIE et W. KUZDZAL

*Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux.
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas. (S. et O.).*

SOMMAIRE

On a déterminé, chaque mois, d'avril 1959 à avril 1960, l'indice d'iode et les teneurs en acides diène, triène et tétraène conjugués et non conjugués de la matière grasse du beurre, obtenu au Centre National de Recherches zootechniques de Jouy-en-Josas.

Les vaches restèrent en pâture de fin avril 1959 à fin octobre 1959 et à l'étable de novembre 59 au début d'avril 60.

Le beurre obtenu à partir du lait du soir et celui obtenu à partir du lait du matin ont été analysés séparément.

En période de stabulation la teneur en diène conjugué est voisine de 0,5 (en g pour 100 g de matière grasse) et s'élève à 1,6 vers la fin de l'été. Les teneurs en diène et tétraène non conjugués sont relativement stables (valeurs moyennes : 1,1 et 0,34 respectivement) mais cependant un peu plus élevées en novembre-décembre. La teneur en acide triène non conjugué ou acide linolénique est un peu plus élevée en période de pâturage (0,6) qu'en période de stabulation (0,4). Des variations notables de la teneur en acide linolénique sont observées toute l'année.

On note que l'été 1959 a été très sec.

I. — INTRODUCTION

Les acides polyinsaturés de la matière grasse du beurre ont été étudiés au cours des dix dernières années par de nombreux auteurs, tant en Europe (MATTSSON, 1949 ; MATTSSON, THOME et SWARTLING, 1951 a et 1951 b ; STADHOUDERS et MULDER, 1955 ; SWARTLING et MATTSSON, 1956 ; MATTSSON et SWARTLING, 1958 ; JENSEN, PEDERSEN et OVERGAARD, 1958 ; KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1961), qu'en Amérique (SMITH et JACK, 1954 ; WOOD et HAAB, 1957) et Nouvelle-Zélande (Mc DOWELL, 1953).

Ces auteurs ont établi que la teneur du beurre en acide diène conjugué est étroitement liée à l'indice d'iode. Nous trouvons ainsi une grande amplitude de variation de cette teneur, avec un maximum vers la fin de l'été dans les pays où le régime de stabulation alterne avec le régime de pâturage. Par contre, lorsque les vaches restent

au pâturage toute l'année (cas de la Nouvelle-Zélande) l'indice d'iode est minimum pendant l'été et la teneur du beurre en diène conjugué atteint elle-même sa valeur minimum à la même époque.

Les teneurs du beurre en triène non conjugué sont généralement plus élevées lorsque l'indice d'iode est lui-même plus élevé.

Un certain désaccord apparaît si l'on confronte les différentes publications concernant l'acide diène non conjugué. Selon certains auteurs (en particulier STADHOUDERS et MULDER, 1955) il y a moins de diène non conjugué pendant la période de pâturage que pendant la période de stabulation. D'après d'autres travaux (MATSSON, THOME et SWARTLING, 1951 b ; WOOD et HAAB, 1957), il semble que la teneur en diène non conjugué du beurre reste relativement stable au cours de l'année.

La teneur du beurre en acide tétraène non conjugué varie peu.

Enfin les teneurs en acides triène et tétraène conjugués qui ont été signalées, nous semblent trop faibles pour que l'existence d'une variation saisonnière soit vraiment démontrée.

Dans la présente publication nous donnons les résultats d'une étude sur les acides polyinsaturés du beurre obtenu au Centre National de Recherches Zootechniques de Jouy-en-Josas. Cette étude a été poursuivie d'avril 1959 à avril 1960.

Nous adopterons les expressions : acides diène, triène et tétraène conjugués d'une part, et diène, triène et tétraène non conjugués d'autre part. En effet, s'il a été montré que l'acide triène non conjugué du beurre est l'acide linoléique de structure *cis-cis-cis* (SHORLAND et HANSEN, 1956) et que l'acide tétraène non conjugué est l'acide arachidonique (déjà isolé du beurre en 1934 par BOSWORTH et SISSON) de structure toute *cis* (SCOTT et al., 1959) il n'en reste pas moins que l'acide diène non conjugué du beurre n'est pas l'acide linoléique ou du moins n'est pas ce seul acide. En effet, dès 1950, SHORLAND signalait qu'il s'agissait sans doute d'un isomère de l'acide linoléique et récemment, en 1959, SCOTT et al. ont montré que l'acide diène non conjugué du beurre était présent sous les trois formes isomériques *cis-cis*, *cis-trans* et *trans-trans*. Quant à l'acide diène conjugué du beurre, on sait qu'il existe sous deux formes isomériques : *cis-trans* et *trans-trans* (SCOTT et al. 1959).

II. — MODE EXPÉRIMENTAL

A — CONSTITUTION DU TROUPEAU

Le troupeau expérimental était constitué d'une vingtaine de vaches dont la moitié était de race Frisonne, l'autre moitié de race Normande. Au cours des 12 mois d'expérience, le stade de lactation des vaches était approximativement compris entre le 2^e et le 7^e mois. Elles étaient toutes soumises aux mêmes conditions d'alimentation et de vie. La rentrée à l'étable a eu lieu du 30 Octobre au 5 Novembre : pendant ces quelques jours les vaches rentrèrent le soir à l'étable et sortirent au pâturage durant la journée.

B — PRÉLÈVEMENTS DE LAIT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON DE BEURRE

Environ une fois par mois, un échantillon moyen pondéré du lait produit à chaque traite par les vaches du troupeau expérimental était préparé. Le lait était ensuite écrémé ; la crème placée 1 à 2 heures à la glacière, puis transformée en beurre au moyen d'un « mixer » tournant à 12 000 tours par minute. Le beurre était lavé, malaxé au moyen de palettes en bois, emballé dans du papier sulfurisé et entreposé à — 15°C.

C — ANALYSE

Le beurre était fondu au bain-marie à 70°C et centrifugé. L'analyse était effectuée sur la matière grasse surnageante ; elle comportait la détermination de l'indice d'iode et le dosage des acides polyinsaturés.

Les acides polyinsaturés ont été dosés par spectrophotométrie dans l'ultra-violet suivant la méthode décrite par BRICE et SWAIN (1945). On a utilisé pour la lecture de l'absorption un spectrophotomètre BECKMAN, D. U.

Le dosage des acides polyinsaturés comportant des doubles liaisons en position conjuguée a été effectué sur la matière grasse dissoute dans le cyclohexane. Les acides polyinsaturés comportant des doubles liaisons en position non conjuguée ont été dosés après isomérisation alcaline (avec une solution de potasse dans le glycérol à 17,5 p. 100 (p/v)). Après isomérisation la solution était diluée avec de l'alcool éthylique absolu. Les proportions des divers acides polyinsaturés ont été obtenues en suivant la méthode de calcul indiquée par BRICE et SWAIN (1945).

III. — RÉSULTATS

Les résultats des analyses sont indiqués dans le tableau 1 et les figures 1, 2 et 3.

TABLEAU I

Indice d'iode et teneur en acides polyinsaturés du beurre

Date des prélèvements	Indice d'iode	Acides polyinsaturés (en g pour 100g de matière grasse)			
		Conjugué	Non conjugués		
		Diène	Diène	Triène	Tétraène
13-4-59 soir.....	33,7	0,6	1,2	0,5	0,4
13-4-59 matin.....	27,6	0,5	1,0	0,4	0,4
22-4-59 soir.....	45,5	1,6	1,2	0,8	0,3
22-4-59 matin.....	41,4	1,4	1,2	0,7	0,2
21-5-59 soir.....	43,8	1,5	1,0	0,6	0,4
22-5-59 matin.....	42,1	1,3	1,2	0,6	0,4
25-6-59 soir.....	44,7	1,5	1,2	0,8	0,4
26-6-59 matin.....	42,5	1,6	1,2	0,8	0,4
24-7-59 soir.....	39,4	1,6	1,0	0,4	0,3
24-7-59 matin.....	37,1	1,5	1,0	0,5	0,8
6-9-59 soir.....	42,7	1,9	0,9	0,6	0,3
7-9-59 matin.....	39,6	1,6	0,7	0,5	0,3
29-9-59 soir.....	39,8	1,7	—	0,7	0,3
30-9-59 matin.....	38,2	1,5	—	0,6	0,3
29-10-59 soir.....	46,2	1,7	1,0	0,7	0,4
30-10-59 matin.....	45,3	1,7	1,1	0,7	0,4
1-12-59 soir.....	28,7	0,5	1,3	0,4	0,4
2-12-59 matin.....	26,4	0,4	1,3	0,3	0,4
4-1-60 soir.....	28,2	0,5	1,2	0,5	0,4
5-1-60 matin.....	26,4	0,5	1,3	0,5	0,4
10-2-60 soir.....	26,3	0,5	1,3	0,4	0,3
11-2-60 matin.....	24,4	0,5	1,3	0,4	0,3
1-2-60 soir.....	26,2	0,5	1,0	0,4	0,3
2-3-60 matin.....	24,9	0,4	1,2	0,3	0,3
4-4-60 soir.....	27,9	0,6	1,1	0,4	0,3
5-4-60 matin.....	26,7	0,4	1,0	0,4	0,3
19-4-60 soir.....	44,6	1,6	1,0	0,7	0,3
19-4-60 matin.....	38,6	1,4	1,0	0,6	0,3

A — INDICE D'IODE

L'indice d'iode est nettement plus élevé (42.0) pendant la période de pâturage que pendant la période de stabulation (28.1). Nous notons qu'au cours de l'été 1959 l'indice d'iode est resté relativement faible et voisin de 40 en juillet, août et septembre.

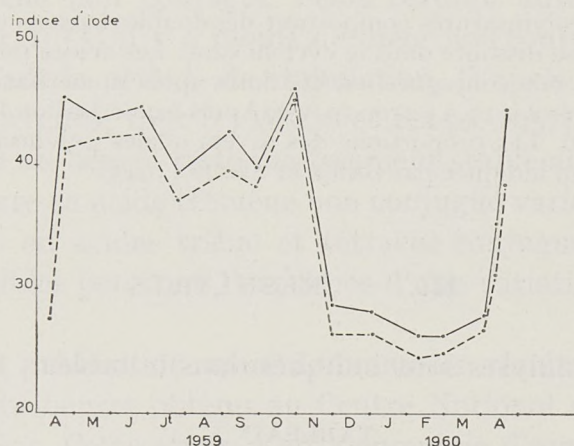


FIG. 1. — Variation de l'indice d'iode du beurre.
 ———— soir - - - - - matin

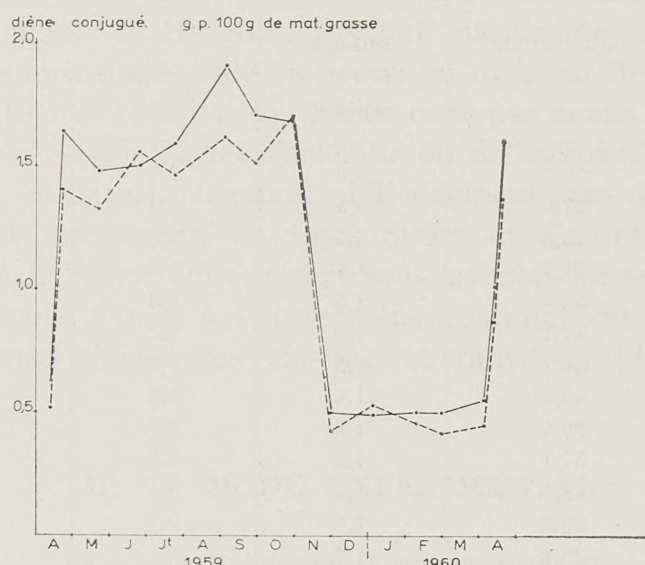


FIG. 2 — Variation de la teneur du beurre en acide gras à diène conjugué.
 ———— soir - - - - - matin

L'indice d'iode est toujours plus élevé le soir que le matin. Les valeurs moyennes sont 36,9 (soir) et 34,2 (matin).

B — ACIDES POLYINSATURÉS

a) Acides conjugués

α) Diène :

La courbe de variation de la teneur en acide diène conjugué du beurre est assez semblable à celle de l'indice d'iode. En effet la teneur en cet acide est nettement

plus élevée pendant la période de pâturage que pendant la période de stabulation (teneurs moyennes respectives 1,6 et 0,5).

Au cours de l'hiver la teneur en acide diène conjugué reste pratiquement constante alors qu'au cours de la période de pâturage on relève des fluctuations notables.

On note une teneur moyenne en diène conjugué sensiblement plus élevée le soir que le matin.

β) Triène et tétraène conjugués :

Ces acides se rencontrent dans le beurre en quantité très faible. Les teneurs moyennes trouvées au cours de notre étude sont 0,013 (valeurs extrêmes : 0,007 et 0,019) pour l'acide triène conjugué et 0,002 pour l'acide tétraène conjugué.

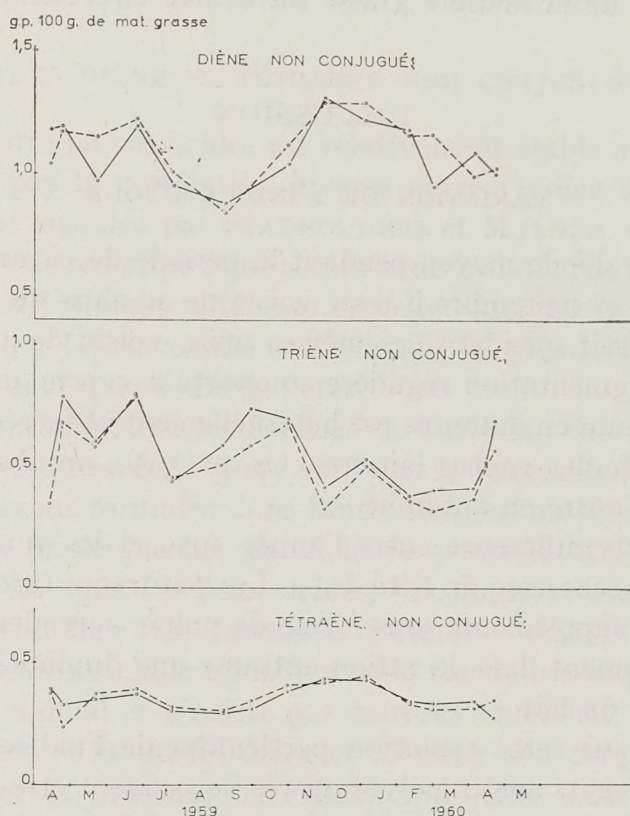


FIG. 3. — Variations des teneurs du beurre en acides gras diène, triène et tétraène non conjugués.

b) Acides non conjugués

α) Diène :

Au cours de l'année, les teneurs en acide diène non conjugué varient peu comparativement à ce que l'on observe pour l'acide diène conjugué. Cependant, on note une diminution notable pendant les mois de juillet et août 1959. Les teneurs moyennes sont, 1,05 et 1,18 respectivement pour la période de pâturage et pour la période de stabulation.

La teneur moyenne en diène non conjugué est du même ordre le soir et le matin.

β) Triène non conjugué :

La teneur en acide triène non conjugué varie avec la saison. La valeur moyenne est un peu plus élevée pendant la période de pâturage 0,64 (au cours de laquelle on

observe des variations importantes) que pendant la période de stabulation (0,40). On note une très légère différence entre la teneur moyenne du lait du soir (0,56) et celle du lait du matin (0,52).

γ) Tétraène non conjugué :

L'amplitude des variations est faible et du même ordre que pour l'acide diène non conjugué. Comme pour ce dernier on trouve une teneur très légèrement plus forte pendant la période de stabulation que pendant la période de pâturage, et la teneur est à peu près la même le soir et le matin.

L'analyse spectrophotométrique effectuée après isomérisation alcaline révèle la présence constante d'un léger pic à 346-348 m μ dû à l'absorption spécifique d'un acide pentaène. La teneur de la matière grasse du beurre en cet acide n'a pas été calculée.

DISCUSSION

VARIATION DE L'INDICE D'IODE

En 1959 l'indice d'iode moyen pendant la période de pâturage est relativement bas. En juillet, août et septembre il reste voisin de 40 alors qu'en 1953, 54, 55 et 56 à Jouy-en-Josas il était, pendant ces mêmes mois, voisin de 45 (KUZDZAL-SAVOIE, 1956, 1959). Une augmentation régulière comportant cependant de petites fluctuations avec un maximum en automne est habituellement observée de la mise à l'herbe à la rentrée à l'étable des vaches laitières. Or, en 1959, on observe deux maxima : l'un au printemps, l'autre en automne.

L'origine de cette différence entre l'année 1959 et les années précédentes doit être attribuée à la sécheresse de l'été 1959. Les pâturages furent insuffisants et les vaches reçurent des suppléments sous forme de pulpe, spécialement en juillet. L'introduction de cet aliment dans la ration entraîne une diminution de l'indice d'iode de la matière grasse du lait.

Nous insistons sur cette variation particulière de l'indice d'iode en 1959, car les teneurs des différents acides polyinsaturés ne peuvent être valablement comparées à celles obtenues par les auteurs étrangers que si la composition de la matière grasse a varié dans tous les cas de façon parallèle. La détermination de l'indice d'iode permet d'établir, approximativement, si cette condition est remplie ou non.

ACIDES DIÈNE CONJUGUÉ ET TRIÈNE NON CONJUGUÉ

Nos propres chiffres confirment les résultats concordants des auteurs cités plus haut.

La teneur en acide diène conjugué augmente nettement dès l'introduction d'herbe dans l'alimentation des vaches laitières et reste élevée pendant toute la période de pâturage. HARTMAN, SHORLAND et MOIR (1956) signalent dans les acides gras extraits du ray-grass (*Lolium perenne*) 0,9 p. 100 de diène conjugué et 62,7 p. 100 (p/p) d'acide linolénique. L'acide linolénique est hydrogéné au niveau du rumen en acide monoène et acide diène conjugué. Simultanément on note la formation d'acides à structure trans (SHORLAND, WEENINK et JOHNS, 1955).

On comprend ainsi, qu'en hiver, pendant la période de stabulation on trouve peu d'acide diène conjugué. Sans doute se produit-il un ralentissement ou un arrêt du processus de synthèse par absence du substrat. On comprend aussi qu'il puisse exister dans le beurre d'été spécialement une notable proportion d'acide monoène à structure trans (acide vaccénique) (CORNWELL et al., 1953).

Tout l'acide linoléique n'est cependant pas transformé. Il en reste une petite quantité dans la matière grasse du beurre, quantité d'ailleurs très variable comme le montrent les courbes obtenues tant à Jouy-en-Josas qu'à Wageningen, en Hollande (STADHOUDERS et MULDER, 1955). Sans doute un facteur intervient-il pour régler la quantité d'acide linoléique passant, sans modification, dans la matière grasse du beurre? Le rôle primordial de cet acide dans l'oxydation du beurre (BADINGS, 1960) confère à cette observation une importance pratique certaine.

ACIDES DIÈNE ET TÉTRAÈNE NON CONJUGUÉS.

La teneur du beurre en ces acides est relativement stable au cours de l'année ; nous ne retrouvons pas la corrélation inverse entre l'indice d'iode et la teneur en diène non conjugué signalée par STADHOUDERS et MULDER, en Hollande (1955). Cependant il convient de remarquer que la courbe de variation de l'indice d'iode observée en 1959 à Jouy-en-Josas est différente de celle observée en 1954 à Wageningen.

Toutefois à Jouy-en-Josas, comme en Hollande, les plus faibles teneurs en diène non conjugué sont observées au cours de l'été.

De façon très approximative les courbes de variation des teneurs en diène et tétraène non conjugués observées à Jouy-en-Josas se ressemblent. Si, en dépit de la restriction que nous avons formulée dans l'introduction, on identifiait l'acide diène non conjugué à l'acide linoléique, ce parallélisme pourrait être interprété comme une confirmation du fait que les deux acides, linoléique et arachidonique, appartiennent à la même « famille » (LE BRETON et FERRET, 1959). Il est d'ailleurs admis (DEUEL, 1951) que l'acide arachidonique dérive de l'acide linoléique par interconversion dans l'organisme animal et n'existe pas dans les végétaux.

Les teneurs du beurre en acides diène et tétraène non conjugués, varient sans rapport apparent avec la présence ou l'absence d'herbe dans l'alimentation des vaches laitières. Ces acides ne sont donc pas directement d'origine alimentaire. Cependant on a pu montrer (MATTSSON, THOME et SWARTLING, 1951 a) qu'une addition d'huile de soja, riche en acide linoléique, à la ration des vaches laitières, provoquait une augmentation de la teneur en diène non conjugué du beurre.

Le fait que l'acide diène non conjugué existe dans le beurre sous différentes formes isomériques appuie l'hypothèse d'une origine multiple de cet acide.

SUMMARY

THE POLYUNSATURATED FATTY ACIDS OF BUTTERFAT. SEASONAL VARIATIONS

From April 1959 to April 1960 a study was made of the content of various polyunsaturated fatty acids in the butterfat.

The experimental herd was composed of about twenty cows. They were turned out to grass at the end of April 1959 and brought back to stall at the beginning of November 1959.

Butter made from evening and morning milkings was analyzed separately.

During the stall period, conjugated diene content was about 0,5 (in g per cent g of fat) and increased during the pasture period to 1,6 at the end of the summer.

Non conjugated diene and tetraene acids contents were relatively uniform (mean values : 1,1 and 0,34 respectively), but a little higher during November and December. The non conjugated triene or linolenic acid content was higher during pasture (0,6) than during the stall period. Important variations of the linolenic acid content were noted throughout the year.

The exceptionally dry weather during the summer of 1959 was taken into account.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BADINGS H. T., 1960. Principles of autoxidation processes in lipids with special regard to the development of autoxidation off-flavours. *Neth. Milk Dairy J.*, **14**, 215-242.
- BOSWORTH A. W. et SISSON E. W., 1934. Arachidonic acid in butter fat. *J. Biol. Chem.*, **107**, 489.
- BRICE B. A. et SWAIN M. L., 1945. Ultra-violet absorption method for the determination of polyunsaturated constituents in fatty materials. *J. Opt. Soc. Amer.*, **35**, 532-544.
- CORNWELL D., BACKDERF R., WILSON C., BROWN J., 1953. The trans-octadecenoic acid content of butter fat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 364-375.
- DEUEL H. J., 1951. The lipids. Their chemistry and biochemistry, Interscience publ. Inc. New-York.
- Mc DOWELL A. K. R., 1953. The properties of New Zealand butters and butterfats. III. Seasonal variations in the nature of the unsaturated acids of butterfat as estimated by spectrophotometric methods. *J. Dairy Res.*, **20**, 100-107.
- HARTMAN L., SHORLAND F. et MOIR R., 1956. Occurrence of transunsaturated fatty acids in horse faeces. *Nature*, **178**, 1057.
- JENSEN H., PEDERSEN A. H., et OVERGAARD S., 1958. Undersogelser vedrorende jersey maelkens anvendelse inden for smorproduktionen. *Beretn. Statens Forsogsmejs*, **113**, 1-51.
- KUZDZAL-SAVOIE S., 1956. Influence du stade de lactation sur les caractéristiques de la matière grasse du beurre. Ann. I. N. R. A., série E. *Technol.* n°1, 30.
- KUZDZAL-SAVOIE S., 1959. Influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse du lait. Ann. I. N. R. A., série E. *Technol.* n° 2, 193-222.
- KUZDZAL-SAVOIE S., et KUZDZAL W., 1961. Influence de la mise à l'herbe des vaches laitières sur les indices de la matière grasse du beurre et sur les teneurs en différents acides gras polyinsaturés. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **1**, (1), 47-69.
- LE BRETON E., et FERRET S., 1959. Quelques aspects actuels du problème des acides gras indispensables et essentiels. La notion des familles d'acides polyinsaturés et ses conséquences. *Expos. ann. Biochim. méd.*, **21**, (9), 135-168.
- MATTSSON S., 1949. Polyunsaturated fatty acids in butter and their influence on the oxidation of butter. 1. Methods of analysis and preliminary results. *Medd. Statens Mejeriforsok*, **26**, 29-46.
- MATTSSON S., THOME K. E. et SWARTLING P., 1951 a. Polyunsaturated fatty acids in butter and their influence on the oxidation of butter. 2. Oxidation of butterfat of different composition. *Medd. Statens Mejeriforsok*, **33**, 1-23.
- MATTSSON S., THOME K. E. et SWARTLING P., 1951 b. Polyunsaturated fatty acids in butter and their influence on the oxidation of butter. 3. Seasonal variation and correlation with peroxide value and oily flavour in butter from different dairies. *Medd. Statens Mejeriforsok*, **35**, 1-20.
- MATTSSON S. et SWARTLING P., 1958. Note on the spectrophotometric determination of polyunsaturated fatty acids in butter. Report n° 55. Dairy department of the Alnarp Institute, Suède.
- SCOTT W. E., HERB S. F., MAGIDMAN P., RIEMENSCHNEIDER R. W., 1959. Unsaturated fatty acids of butterfat. *J. Agric. Food Chem.*, **7**, 125.
- SHORLAND F., 1950. C₁₈ unsaturated acids of butterfat. *Nature*, **166**, 745.
- SHORLAND F., WEENINK K., JOHNS A., 1955. Effect of the rumen on dietary fat. *Nature*, **175**, 1129.
- SHORLAND F., et HANSEN R., 1956. Studies on the composition of New Zealand butterfat. 14^e Intern. Dairy Cong. Rome, II (1), 613.
- SMITH L. M. et JACK E. L., 1954. The unsaturated fatty acids of milk fat. II. Conjugated and non conjugated constituents. *J. Dairy Sci.*, **37**, 390-398.
- STADHOUDERS J. et MULDER H., 1955. The composition of dutch butter fat. I. Seasonal variations in the unsaturated fatty acid composition of butter fat. *Neth. Milk Dairy J.*, **9**, 182-193.
- SWARTLING P. et MATTSSON S., 1956. On the composition and properties of Jersey milk. *Medd. Statens Mejeriforsok*, **47**, 1-40.
- WOOD F. W. et HAAB W., 1957. Seasonal and regional variations in the unsaturated acids of Alberta butterfat. *Canad. J. Anim. Sci.*, **37**, 1-7.

Le Directeur Gérant : M.L. CAGNAC.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 23-5-1961

Dépôt légal : 2^e trimestre 1961. N° d'impression : 659

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ LA LEVURE

Huguette de ROBICHON SZULMAJSTER

Laboratoire d'Enzymologie, Centre national de la Recherche scientifique, Gif-sur-Yvette (S. et O.)

PLAN DU MÉMOIRE

1. INTRODUCTION.

2. ABRÉVIATIONS.

3. MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

- 3.1 Matériel biologique : souches.
- 3.2 Matériel chimique : produits.
- 3.3 Matériel biochimique : enzymes.
- 3.4 Milieux de culture : naturels, synthétiques, gélosés ; entretien des souches.
- 3.5 Méthodes de culture.
- 3.6 Méthodes manométriques.
- 3.7 Broyats : technique de NOSSAL.
- 3.8 Dosage des protéines.
- 3.9 Dosages spectrophotométriques.
- 3.10 Dosages à l'aide du ^{14}C -galactose.
- 3.11 Mesure de la radioactivité : — ^{14}C — Tritium.
- 3.12 Spectrofluorométrie.
- 3.13 Techniques chromatographiques.
- 3.14 Dosage chimique de DPN.
- 3.15 Dosage des 2-désoxysucres.
- 3.16 Détermination de la concentration en sulfate d'ammonium.

4. MÉTABOLISME DU GALACTOSE.

- 4.1 Introduction.
- 4.2 Mise en évidence des enzymes du métabolisme du galactose chez la levure.
- 4.3 Métabolisme du 2-désoxy-D-galactose.
- 4.4 Étude de l'UDPGal-4-épimérase.
- 4.5 Discussion.
- 4.6 Résumé.

5. CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE.

- 5.1 Introduction.
- 5.2 Détermination du rôle du gène G_1 .
- 5.3 Détermination du rôle du gène G_2 .
- 5.4 Discussion.
- 5.5 Résumé.

6. BIOSYNTÈSE INDUITE DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE.

- 6.1 Introduction.
- 6.2 Mise en évidence du caractère adaptatif des enzymes du métabolisme du galactose : comparaison entre *S. cerevisiae* et *S. fragilis*.
- 6.3 Étude de l'induction des enzymes du métabolisme du galactose.
- 6.4 Étude de la période de latence précédant l'adaptation au galactose.
- 6.5 Étude cinétique de l'adaptation et de quelques facteurs capables de la modifier.
- 6.6 Étude comparative des vitesses de biosynthèse de plusieurs enzymes inductibles.
- 6.7 Adaptation en anaérobiose.
- 6.8 Relations existant entre respiration, fermentation aérobie et fermentation anaérobie du galactose.

- 6.9 Teneur en enzymes du métabolisme du galactose en rapport avec le mode d'adaptation.
 - 6.10 Discussion.
 - 6.11 Résumé.
7. REMARQUES SUR LE CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DE LA FORMATION DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE, CHEZ *S. cerevisiae*.
8. RÉSUMÉ GÉNÉRAL.

I. — INTRODUCTION

Si les mécanismes présidant à la synthèse protéique sont loin d'être connus, il n'en existe pas moins un postulat commun à toutes les recherches faites dans ce domaine : la synthèse de chaque molécule protéique spécifique requiert un modèle, ou tout au moins un ensemble d'« informations » qui doivent être automatiquement et fidèlement transmises, de génération en génération. Il est évident que les seules entités connues capables de satisfaire ces critères sont les gènes.

La théorie du contrôle héréditaire effectué par les gènes sur les capacités enzymatiques d'une cellule est très ancienne (GARROD, BATESON, 1909 ; BEIJERINCK, 1917). BEADLE et EPHRUSSI lui ont donné en 1936-37 son premier appui expérimental en établissant une corrélation nette entre la formation de substances spécifiques diffusibles aboutissant à la synthèse des pigments des yeux de la *Drosophile* et chacun des gènes impliqués dans cette synthèse. Toutefois, c'est grâce à l'utilisation de micro-organismes capables de croître sur des milieux synthétiques simples et se prêtant à l'expérimentation génétique classique (croisement et étude de la ségrégation des caractères) et grâce à l'isolement à partir de tels microorganismes (*Neurospora*, levures, *E. coli* et salmonelles) de mutants biochimiques — c'est-à-dire de mutants différant du type sauvage par un besoin nutritif pour une substance chimique définie — que cette théorie a pu progresser et établir ses bases les plus solides.

Chaque fois que l'effet biochimique d'une mutation du type auxotrophique a pu être localisé d'une manière précise, la perte du pouvoir de biosynthèse d'un produit métabolique a été constatée, souvent accompagnée de l'accumulation des produits intermédiaires et de la suppression de l'activité de l'enzyme effectuant la réaction bloquée.

L'isolement de différents mutants nécessitant le même produit final pour leur croissance, mais chez lesquels la mutation se trouve localisée à différentes étapes de la chaîne de biosynthèse, a permis de reconstituer cette chaîne, de caractériser les métabolites intermédiaires et les enzymes effectuant leur transformation.

Dans chacun des nombreux schémas ainsi élucidés, qu'il s'agisse de la biosynthèse de divers acides aminés, vitamines, purines ou pyrimidines, l'absence d'une seule enzyme correspondait à la mutation d'un seul gène. L'existence d'une telle corrélation avait amené BEADLE, dès 1945, à formuler l'hypothèse dite « un gène — un enzyme », laquelle consiste à considérer non seulement que l'action d'un gène s'effectue au niveau de la synthèse des enzymes, mais que la formation de chaque enzyme requiert la participation d'un gène particulier. Un corollaire de cette hypothèse est que la fonction d'un gène réside dans le contrôle de la synthèse d'une seule enzyme.

Grâce aux recherches de BENZER, HARTMAN, LEDERBERG, etc... la structure fine des gènes a pu être établie et de nombreux *loci* divisés en un grand nombre d'unités capables de mutations indépendantes, capables de recombinaisons intragéniques, chacune représentant une unité fonctionnelle déterminée (mutons, recons, cistrons).

L'étude du métabolisme du galactose et de son déterminisme héréditaire s'est jusqu'ici trouvée au centre de différents problèmes, tant biochimiques que génétiques dont l'intérêt ne cesse de s'accroître.

Du point de vue biochimique, la découverte de l'uridine diphospho-galactose et de l'uridine diphosphoglucose (LELOIR, 1951) a apporté l'un des premiers exemples de l'observation qu'un substrat doit être « activé » sous la forme d'une combinaison nucléotidique afin de pouvoir subir certaines transformations métaboliques. En ce qui concerne les sucres, LELOIR a montré que la forme activée est constituée par la liaison d'une molécule d'hexose avec un nucléotide uridylique. Cette découverte a été, par la suite, généralisée à beaucoup d'autres composés. Bien que la signification profonde de ces mécanismes reste encore à élucider, il semble que la formation de dérivés nucléotidiques spécifiques (uridyl- ou guanosyl- pour les composés aldéhydriques, — cytidyl- pour les alcools, -adényl- pour les acides) soit indispensable, aussi bien pour permettre certaines réactions d'interconversion, que pour la formation de molécules plus complexes. L'uridine diphosphogalactose et l'uridine diphosphoglucose constituent les plaques tournantes à partir desquelles d'autres hexoses, des pentoses, des di- et des polysaccharides peuvent être synthétisés (cf. STROMINGER, 1959).

Du point de vue génétique, l'étude du mode de transmission des caractères concernant la capacité d'utiliser le galactose, chez certaines souches de *E. coli*, a apporté une contribution importante à l'étude du phénomène de « transduction », découvert par ZINDER et LEDERBERG, 1952. Ce matériel a, de plus, permis de mettre en évidence l'un des aspects du caractère complexe du contrôle exercé par les gènes sur la synthèse de protéines spécifiques : par exemple, la formation de l'une des enzymes du métabolisme du galactose, la galactose-1-phosphate/glucose-1-phosphate uridyltransférase, est déterminée par un « cistron » au sein duquel quatre mutations génétiquement distinctes ont déjà été mises en évidence (MORSE, LEDERBERG et LEDERBERG, 1956 ; KURAHASHI, 1956).

D'autre part, l'étude du métabolisme du galactose chez l'homme a permis d'apporter l'un des rares exemples d'une maladie héréditaire humaine dont l'effet ait pu être localisé au niveau enzymatique : la galactosémie. Cette maladie est due, en effet, à l'absence de l'une des enzymes du métabolisme du galactose : la galactose-1-phosphate/ glucose-1-phosphate uridyltransférase (KALICKAR, ANDERSON et ISSELBACHER, 1956).

C'est l'étude de l'apparition de la capacité de fermenter le galactose chez certaines souches de levures qui a été à l'origine de la découverte de l'« adaptation enzymatique » (DUCLAUX, 1899 ; DIENERT, 1900, puis STEPHENSON et YUDKIN, 1936). Ce phénomène, qui n'a cessé d'être étudié depuis, continue à jouer un rôle capital dans l'étude des mécanismes de régulation métabolique et génétique qui contrôlent la biosynthèse et la spécificité des protéines.

J'ai abordé l'étude du métabolisme du galactose et de son contrôle génétique chez les levures pour les raisons suivantes :

— 1^o La présence du système enzymatique assurant dans son ensemble l'isomérisation du galactose en glucose (système LÉLOIR-KALICKAR), chez les levures, semblait certaine. Il restait toutefois à s'assurer de son importance métabolique, et à savoir, en particulier, s'il existait une autre voie enzymatique conduisant à l'utilisation du galactose chez cet organisme.

— 2^o L'existence de deux gènes indépendants, intervenant dans le métabolisme du galactose, chez les levures, avait été montrée (cf. HAWTHORNE, 1956). Il avait été suggéré que l'un de ces deux gènes contrôle la présence de l'une des enzymes du métabolisme du galactose, tandis que l'autre contrôlerait la présence d'un mécanisme de perméabilité au galactose (DOUGLAS et CONDIE, 1952). Toutefois, le rôle de ces gènes n'avait pu être démontré de manière décisive, faute de techniques spécifiques et de connaissances concernant la nature des facteurs responsables de la perméabilité cellulaire. Le troisième gène contrôle un caractère qui est en rapport avec la vitesse d'adaptation au galactose (LINDEGREN, SPIEGELMAN et LINDEGREN, 1944). Le mode d'action de ce gène n'a pas encore été précisé.

— 3^o Le caractère adaptatif du complexe enzymatique responsable de la fermentation du galactose (galactozymase) avait fait l'objet de nombreux travaux, mais les composants de ce complexe enzymatique n'avaient jamais été étudiés individuellement et les caractéristiques essentielles de cette adaptation restaient assez confuses. Plusieurs questions demeuraient donc posées :

- a) Le caractère adaptatif s'applique-t-il à toutes les enzymes du système?
- b) S'agit-il d'une synthèse protéique *de novo* de ces enzymes?
- c) Quels sont les facteurs conditionnant leur formation adaptative?

Il a donc semblé intéressant, étant donné les possibilités d'analyse génétique qu'offre la levure pour la continuation ultérieure de l'étude de ce problème, d'entreprendre un travail de clarification sur différents plans, biochimique, génétique et adaptation enzymatique, touchant au métabolisme du galactose chez cet organisme.

Après la description des techniques employées, l'exposé des résultats obtenus au cours de ce travail sera donc divisé en trois parties principales se rapportant chacune à l'un des aspects du problème du métabolisme du galactose chez les levures : biochimie, déterminisme héréditaire et induction des enzymes qui assurent la transformation du galactose en glucose. Chacun de ces trois chapitres principaux sera précédé d'une introduction et suivi d'une discussion détaillée. La présente introduction, ainsi que la discussion finale, seront donc très succinctes.

— A) Au cours de la première partie (chapitre 4), les connaissances actuelles concernant le métabolisme du galactose seront résumées. La présence des enzymes assurant le métabolisme du galactose sera mise en évidence chez plusieurs souches de levures. L'une de ces enzymes, l'uridine-diphospho-galactose-4-épimérase, a été purifiée. La méthode employée et les principales propriétés de cette enzyme seront présentées en détail. L'une des explications possibles du mécanisme de la réaction catalysée par cette enzyme fera l'objet d'une discussion approfondie.

— B) La deuxième partie de cet exposé (chapitre 5) sera consacrée à l'étude du rôle des gènes connus intervenant dans le contrôle du métabolisme du galactose chez les levures. L'état de nos connaissances sur ce sujet ayant été résumé au cours de l'introduction à ce chapitre, il sera montré ensuite que l'un des gènes impliqués contrôle la formation de la galactokinase dans la souche étudiée. La détermination du rôle du second gène n'a été rendue possible que grâce à la mise en évidence d'un

système assurant le transport actif du galactose. Quelques-unes des propriétés de ce système, qui seront exposées en détail, ont permis de l'identifier à une « galactose-perméase ». Il ressort des expériences effectuées au cours de ce travail que la formation de cette galactose-perméase est placée sous le contrôle de ce second gène.

— C) L'étude du caractère adaptatif des enzymes du métabolisme du galactose sera exposée au cours de la troisième partie (chapitre 6). Une brève introduction situera les connaissances acquises concernant la formation induite de la « galactozymase » par rapport aux développements les plus récents de la biosynthèse induite des systèmes mieux connus. Il sera montré que le caractère adaptatif concerne les quatre enzymes assurant le métabolisme du galactose chez la levure, que la formation de ces enzymes est induite par le galactose, selon un mécanisme d'« induction simultanée » et qu'il s'agit, très probablement, d'une biosynthèse *de novo* de ces enzymes. Quelques-uns des facteurs capables d'influer sur la biosynthèse induite de ce système enzymatique seront étudiés.

Cet exposé se terminera par une courte discussion concernant l'ensemble des résultats obtenus et permettant de replacer le problème dans son contexte général.

II. — ABRÉVIATIONS

Les abréviations suivantes seront utilisées au cours de cet exposé :

Gal : D-Galactose

Glu : D-Glucose

DeGal : 2-désoxy-D-galactose

DeGlu : 2-désoxy-D-glucose

Gal-1-P : α -D-Galactose-1-Phosphate

G-1-P : α -D-Glucose-1-Phosphate

G-6-P : Glucose-6-Phosphate

UDPGal : Uridine-diphospho-galactose

UDPG : Uridine-diphospho-glucose

ATP, ADP, UTP, UDP : Adénosine-triphosphate, adénosine-diphosphate, Uridine triphosphate, uridine-diphosphate, respectivement

TPN, DPN : Triphosphopyridine nucléotide, diphosphopyridine nucléotide respectivement

TPNH, DPNH : la forme réduite des deux composés précédents

PP : Pyrophosphate inorganique

UDPGA : Acide uridine-diphospho-galacturonique

Les valeurs des mesures manométriques seront exprimées de la manière suivante :

$Q_{\text{gaz étudié}}^{\text{atmosphère}}$

L'atmosphère ne sera pas mentionnée lorsqu'il s'agit d'expériences effectuées à l'air.

Q_{O_2} : nombre de mm³ d'oxygène absorbé pendant 1 heure par mg de poids sec de la préparation, dans l'air.

Q_{CO_2} : nombre de mm³ de CO₂ dégagé pendant 1 heure par mg de poids sec de la préparation, dans l'air.

$Q_{CO_2}^{N_2}$: nombre de mm³ de CO₂ dégagé pendant 1 heure par mg de poids de la préparation, dans l'azote.

Q_{CO_2} (ferm.) : nombre de mm³ de CO₂ dégagé pendant 1 heure par mg de poids sec de la préparation, mesuré dans l'air par la méthode du double manomètre (cf. UMBREIT et coll., 1949).

Les valeurs des mesures spectrophotométriques seront exprimées selon la manière classique :

E : extinction = $\log_{10}$ de I_0/I

où I_0 = intensité de la lumière incidente,

I = intensité de la lumière transmise.

Ces extinctions ont toujours été mesurées après traversée d'une couche de 1 cm d'épaisseur de la solution étudiée.

III. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

3.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

J'ai utilisé au cours de ce travail les souches de levure suivantes se rattachant à deux espèces : *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces fragilis*.

S. cerevisiae :

1) 59 RT : Souche haploïde, provenant de la collection de M. le Professeur B. EPHRUSSI.

2) B 15 : Souche haploïde provenant du stock de M. le Professeur B. EPHRUSSI (cf. LEUPOLD et HOTTINGER, 1954).

3) 1235-2b : Souche haploïde provenant de la collection de D. C. HAWTHORNE (cf. HAWTHORNE, 1956).

4) 1238-5d : Souche haploïde provenant de la collection de D. C. HAWTHORNE.

5) 1213-4c : Souche haploïde provenant de la collection de D. C. HAWTHORNE.

6) CH-1 : Souche diploïde que j'ai isolée à partir du croisement en masse des deux souches haploïdes 1235-2b $\times$ 1238-5d (cf. LINDEGREN et LINDEGREN, 1943). La suspension cellulaire, contenant des zygotes en nombre important et un excès de cellules haploïdes n'ayant pas copulé a été étalée sur milieu solide (H8) contenant du galactose comme seule source de carbone. Une colonie isolée a été prélevée et mise en suspension dans du Ringer. Une partie de cette suspension a été inoculée dans un milieu liquide (H8, T, galactose). Après culture en aérobiose (24 heures, 28°) un nouvel étalement a été effectué de façon à obtenir 100 à 200 colonies par boîte de Pétri. Le cycle de ces opérations (culture en milieu liquide, étalement sur milieu solide, prélèvement d'une colonie isolée) a été répété six fois. La souche ainsi isolée présente un caractère microscopique très homogène de cellules diploïdes et ses caractères biochimiques (voir partie expérimentale) montrent qu'il s'agit bien du diploïde escompté.

S. fragilis :

1) 10022 : diploïde provenant de l'« American Type Culture Collection ».

3.2 MATÉRIEL, CHIMIQUE :

1) *Galactose* : Le galactose utilisé provenait de plusieurs sources (Nutritional Biochemical Corp., Mann, Hoffman La Roche). Il a été utilisé tel quel pour les cultures en milieu naturel. Toutefois, pour certaines cultures en milieu synthétique, et pour toutes les expériences manométriques ou enzymologiques, l'emploi de galactose purifié s'est avéré nécessaire.

Détection des impuretés présentes dans le galactose : par chromatographie dans plusieurs solvants des sucres (voir 3.13) tous les échantillons de galactose commerciaux produisent trois taches, la plus importante étant évidemment due au galactose pur. L'une des taches supplémentaires, variable en importance, correspond, selon les Rf. observés, à du glucose. La troisième tache, toujours faible, semble, d'après les Rf., correspondre à un disaccharide réducteur. Il n'a pas été fait d'effort spécial pour identifier plus précisément ce composé. Il y a lieu, toutefois, de remarquer qu'une souche de levure galactose négative, 59 RT, montre une croissance faible lorsque le galactose non-purifié est employé dans le milieu synthétique H8 galactose et que, parallèlement, non seulement la tache correspondant au glucose, mais également la troisième tache, disparaissent. Au cours d'expériences manométriques, j'ai pu constater que ce composé est fermenté adaptativement par la souche 59 RT. Il se pourrait donc que ce soit du maltose.

Dosage de l'impureté glucose : La quantité de glucose présente est déterminée manométriquement, en mesurant le dégagement total de CO_2 produit par une levure galactose-négative en présence d'une quantité connue de galactose non-purifié. La quantité de glucose présente à l'état d'impureté dans le galactose commercial, ainsi estimée, peut varier entre 0,5 et 5 p. cent selon les échantillons.

Purification du galactose : La purification a été effectuée surtout dans le but d'éliminer le glucose. Les progrès de la purification ont été suivis par la méthode manométrique précédemment indiquée.

La technique de purification finalement adoptée est la suivante : Le galactose (entre 500 g et 2 kg.) est dissout à chaud dans le minimum possible d'eau distillée. La solution sursaturée, souvent très jaune, dont le volume a été mesuré, est mise, après refroidissement, dans un bain à -5° . Deux volumes d'alcool absolu, également refroidis à -5° , sont alors ajoutés rapidement en agitant fortement le mélange. Après une nuit à 0° , une masse visqueuse, retenant une grande partie de la coloration, s'est déposée dans le fond du bécher. La suspension surnageante (contenant des cristaux fins peu abondants) est alors décantée dans un autre bécher. La cristallisation massive est initiée dans ce mélange en frottant énergiquement les parois du bécher avec un agitateur. On laisse la cristallisation se poursuivre encore pendant quelques heures et on filtre sur Büchner. Les cristaux sont ensuite lavés abondamment à l'alcool absolu refroidi, et à l'éther. Le rendement de cette première recristallisation est environ 40-50 p. cent. L'ensemble de ces opérations est répété une seconde fois. Si la solution de galactose ainsi purifiée est encore jaune, on la décolore par addition de Norite, on filtre et on effectue une troisième recristallisation. Le rendement final se situe aux environs de 20 p. cent.

Le galactose purifié par cette méthode, contient au maximum 0,1 p. cent de glucose. Toutefois, la seconde impureté peut encore être décelée par chromatographie sur papier. Mais, étant donné sa faible quantité et l'absence d'interférence

notable avec les déterminations, il n'a pas été essayé de l'éliminer complètement.

2) *Galactose-1-¹⁴C* : Ce produit a été préparé par le Dr. ISBELL, « National Bureau of Standards », USA. Radioactivité spécifique : entre 15 et 20 $\mu\text{C}/\mu\text{mole}$, selon les préparations.

Galactose-¹⁴C-uniformément marqué : Ce produit, provenant du « C. E. A. » a été généreusement offert à l'auteur par M. le Professeur J. MONOD ; radioactivité spécifique : 8 $\mu\text{C}/\mu\text{mole}$.

3) *α -D-Galactose-1-phosphate* : Ce produit a été synthétisé chimiquement selon la méthode de PUTMAN et HASSID, 1957.

4) *Uridine-diphospho-galactose* : Ce produit a été synthétisé enzymatiquement et purifié par chromatographie sur papier, selon la méthode de E. MAXWELL, 1957.

5) *Glucose-1-6-diphosphate* : Ce produit est un cadeau du Dr. LELOIR de Buenos-Ayres.

6) *2-Désoxygalactose et 2-désoxyglucose* : Les échantillons utilisés au début de ce travail étaient un cadeau du Dr. LANDAU (N. I. H., Bethesda, USA) ; les produits utilisés ultérieurement provenaient des Laboratoires Aldrich, USA.

7) *Les produits suivants* : Uridine-diphosphoglucose, TPN, DPN, ATP, G-1-P, G-6-P, proviennent des maisons PABST ou SIGMA, USA.

8) *L'eau tritiée* (50-100 mC/ml selon les échantillons) : provient de TRACERLAB, USA.

9) *L'azote pur* (< 0,005 p. cent d'O₂) : est la qualité « R » de la maison AIR LIQUIDE, Paris.

10) *DEAE-cellulose* (N-N-diéthylaminoéthylcellulose) : provient de la maison EASTMAN KODACK.

11) *Billes de verre* : Minnesota Mining and Manufacturing Company, St Paul, Minn., USA, n° 150 (95-115 μ).

3.3. MATÉRIEL ENZYMATIQUE.

Plusieurs enzymes, employées comme réactifs dans les tests enzymatiques qui seront décrits plus loin, ont été préparées au laboratoire.

1) *Glucose-6-phosphate-déshydrogénase* : selon la méthode de KORNBERG, 1950.

2) *Phosphoglucomutase* : selon la méthode de NAJJAR, 1948.

3) *UDPG-déshydrogénase* : selon la méthode de STROMINGER et coll., 1957.

4) *UDPGal-4-épimérase de foie de mammifère* : selon la méthode de MAXWELL, 1957.

5) *Gal-1-P/G-1-P-uridylyltransférase* : Selon la méthode de KURAHASHI et ANDERSON, 1958.

6) *Poudre acétonique de foie* (utilisée pour l'extraction de l'UDPG déshydrogénase et de l'UDPGal-4-épimérase) : selon la méthode de HORECKER, 1950.

7) *Extraits bruts* : de mutants de *E. coli* ou de levure (utilisés comme source de Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase ou de galactokinase) : selon la méthode de préparation des extraits décrite plus loin.

D'autres enzymes ont été, soit des produits commerciaux, soit préparés dans d'autres laboratoires.

8) *DPNase de Neurospora* : cadeau de STOLZENBACH, Johns HOPKINS University, USA.

9) *DPNase de Clostridium* : cadeau de E. R. STADTMAN, National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA.

10) *Alcool-déshydrogénase* et *Lactico-déshydrogénase cristallines* : ont été achetées chez « Worthington Biochemical Co ».

3.4. MILIEUX DE CULTURE.

Milieux naturels :

Milieu L :

Extrait de Levure DIFCO, 5 g.

Glucose, 30 g.

Eau distillée, q. s. pour 1 litre.

Ce milieu est utilisé pour les précultures effectuées à partir de cultures stock.

Milieu L gélosé. à 25 g. par litre : Ce milieu est utilisé pour l'entretien et la conservation des souches.

Milieu 3S :

a) Extrait de levure DIFCO : 10 g.

KH_2PO_4 : 1 g.

SO_4Am_2 : 1,2 g.

Eau distillée: q. s. pour 1 litre.

b) Glucose .60 g. par litre.

c) Galactose: 60 g. par litre.

Les solutions, stérilisées séparément, sont mélangées stérilement (1 volume de la solution saline — 1 volume de la solution du sucre désiré) au moment de l'utilisation.

Milieux synthétiques :

Milieu H8 :

a) SO_4Mg : 1,4 g.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 2,0 g.

CaCl_2 0,8 g.

SO_4Am^2 : 7,0 g.

NaCl : 1,0 g.

$\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$: 0,4 g.

Ca Panthoténate : 0,8 g.

Biotine : 0,004 g.

Eau distillée : q. s. pour 1 litre.

Pour éviter toute précipitation, chaque sel est dissout séparément et ajouté à 500 ml d'eau distillée. La solution est alors complétée à 1 litre.

b) Glucose : 60 g par litre.

ou c) Galactose : 60 g par litre.

Les solutions, stérilisées séparément, sont mélangées stérilement, volume à volume, au moment de l'emploi.

Milieux H8 complémentés. — Pour la culture des mutants auxotrophes, le milieu précédent peut être additionné de :

L-Tryptophane, L-Histidine, L-Méthionine, Uracile, séparément ou en combinaisons diverses, à la concentration finale de 100 mg par litre.

Ces composés sont ajoutés stérilement au milieu H8, à partir de solutions à 10 mg/ml, stérilisées indépendamment.

Milieux H8 et H8 complémentés, gélosés : La composition est la même que précédemment, mais 50 g de gélose purifiée DIFCO sont ajoutés à la solution a) avant stérilisation. Les mélanges désirés sont alors effectués avant le refroidissement complet de cette solution.

3.5 MÉTHODES DE CULTURE.

1) *Milieux solides*

Les milieux solides ont été utilisés ici dans le but de déterminer ou de contrôler les marqueurs biochimiques des souches utilisées. Des boîtes de Pétri sont préparées, contenant environ 20 ml des milieux gélosés nécessaires (H8 minimum, H8 complémentés, H8 complet et L). La boîte est partagée en segments et on étale à l'anse une souche par segment à partir d'une suspension fraîchement préparée dans du Ringer d'un prélèvement| effectué à l'anse à la surface de la culture stock. Seule une croissance résiduelle est observée en absence du facteur auxotrophique nécessaire à la croissance.

2) *Milieux liquides*

En aérobiose. — Les cultures aérobies, quelle que soit leur taille et le milieu employé, ont toujours été effectuées en fioles d'ermeneyer, le milieu liquide représentant un dixième de la capacité totale et une bonne aérobiose assurée par agitation mécanique constante dans une étuve ou une chambre à 25°. Lorsque de grandes quantités de levure ont été nécessaires, le nombre de fioles a simplement été multiplié afin d'obtenir la quantité désirée.

En anaérobiose. — Les cultures anaérobies ont été effectuées dans des ballons rodés (cf. STIER et coll., 1950) dont le bouchon contient d'une part un tube allant jusqu'au fond du ballon, pour permettre d'effectuer le barbotage d'azote, et d'autre part, un tube court, relié à une soupape à mercure, permettant, sans rentrée d'air, l'évacuation des gaz résultant de la croissance. Un robinet à trois voies commande le tout. Dans ces ballons, de taille variant entre 200 ml et 3 litres, le milieu liquide représente environ la moitié de la capacité totale. Après inoculation, à partir d'une préculture aérobie, on fait barboter de l'azote « R » à fort débit dans la fiole pendant au moins 40 minutes, la soupape ayant été préalablement munie de mercure, et tous les rodages soigneusement graissés. Le robinet est ensuite fermé de façon à couper le contact avec le milieu extérieur et les fioles transférées dans une étuve ou une chambre à 25° où elles sont agitées mécaniquement.

3) *Mesure de la croissance*

La croissance des cultures en milieu liquide a été suivie par néphélométrie, soit au Beckman à 600 mμ, soit à l'aide de l'électrophotomètre Meunier, en utilisant le filtre jaune dont le maximum de transmission est 546 mμ. Une étude préliminaire

ayant montré que pour les souches employées il y a proportionnalité entre les lectures et la concentration en cellules pour la zone 0,02 à 0,3 unités de Densité optique au Beckman, et entre 10 et 100 divisions arbitraires de l'électrophotomètre Meunier, des dilutions sont effectuées chaque fois qu'il est nécessaire afin que les mesures

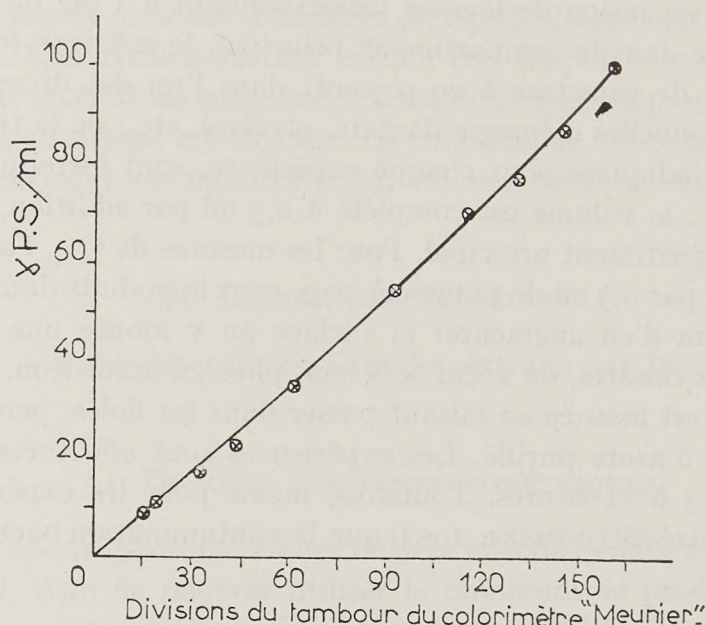


FIG. 1. — Courbe de correspondance entre le poids sec et la densité optique des suspensions de levure.

Les densités optiques sont exprimées en unités arbitraires correspondant aux divisions du tambour du colorimètre de Meunier.

100 divisions (filtre jaune) correspondent à une densité optique de 0,2 (mesurée dans le Beckman à 600 m μ). Un aliquote de chaque suspension ayant servi aux mesures de densité optique, a été ensuite filtré sur un micro ultra-filtre en verre fritté, préalablement taré. Les cellules retenues sur le filtre ont été lavées abondamment puis desséchées à 110°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

soient faites dans ces zones de proportionnalité. Si cela est impossible, on se rapporte à une courbe de correspondance, Poids sec/Densité optique, établie expérimentalement, du type de celle reproduite dans la figure 1. Les poids secs ont été déterminés par dessiccation de prises connues d'une suspension de levure, à 110°, dans des récipients tarés, jusqu'à obtention d'un poids constant.

4) Récolte-Lavage

Sauf indication spéciale, les cellules ont été généralement récoltées pendant la dernière génération de la croissance. La taille de l'inoculum et le temps nécessaire à la croissance complète ont été calculés de telle sorte que les cultures soient, en tous cas, maintenues le moins longtemps possible après la fin effective de la croissance. Ceci permet de combiner un bon rendement avec l'obtention de cellules dans un état physiologique satisfaisant et assez comparable d'une expérience à l'autre.

Les cellules sont séparées du milieu de culture par centrifugation et lavées trois fois dans le tube à centrifuger par resuspension dans un volume égal de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0, centrifugation et décantation du liquide surnageant. Les levures sont ensuite suspendues dans un volume du même tampon, calculé de façon à obtenir la concentration en cellules désirée.

3.6 MÉTHODES MANOMÉTRIQUES.

Les mesures manométriques ont été effectuées selon la méthode de WARBURG (cf. DIXON, 1943, et UMBREIT et coll., 1949).

Les cupules ont été utilisées avec un volume liquide total de 2,3 ml. Une prise convenable de la suspension de levures (correspondant à 1 mg de poids sec de cellules) est introduite dans le compartiment principal, le substrat (0,2 ml d'une solution de glucose ou de galactose à 20 p. cent) dans l'un des diverticules latéraux. Les sources additionnelles d'énergie (lactate, glycérol, etc.) ou le tryptophane, selon les concentrations indiquées pour chaque expérience, sont introduits dans le second diverticule latéral : le volume est complété à 2,3 ml par addition de tampon phosphate dans le compartiment principal. Pour les mesures de Q_{O_2} , l'absorption du CO_2 dégagé est assurée par 0,3 ml de potasse à 20 p. cent introduits dans le petit compartiment central. Afin d'en augmenter la surface on y ajoute une bande de papier filtre Durieux, sans cendres, de 1 cm $\times$ 3 cm, pliée en accordéon.

L'anaérobiose est assurée en faisant passer dans les fioles, pendant 15 à 20 minutes, un courant d'azote purifié. Les expériences sont effectuées à 28°, pour des durées variant de 3 à 11 heures. Toutefois, même pour les expériences de longue durée, il a été montré (SLONIMSKI, 1953) que la contamination bactérienne est négligeable.

3.7 BROYATS.

Les broyats de levure ou de *E. coli* ont été effectués dans l'appareil de NOSSAL (NOSSAL, 1953) de la manière suivante : après lavage des cellules (voir plus haut) la dernière centrifugation est effectuée dans un tube gradué. Le volume du culot peut être ainsi évalué. On y ajoute trois volumes de tampon glycine, pH 7,5, 0,1 M. Les meilleurs résultats ont été obtenus en employant 8 à 9 ml de la suspension épaisse ainsi préparée par tube de l'appareil. Cependant, lorsqu'il n'avait pas été possible d'obtenir une masse cellulaire aussi importante, les volumes ont été diminués jusqu'à 2 ml tout en gardant les mêmes proportions dans la préparation de la suspension. Les tubes de NOSSAL sont refroidis à -30° pendant plusieurs heures avant leur emploi, ainsi que des portions adéquates de billes de verre (95-115 μ de diamètre). A la suspension cellulaire introduite dans le tube refroidi est ajouté un poids égal au volume de cette suspension de billes de verre, également refroidies. Le tube fermé est alors rapidement introduit dans l'appareil (se trouvant dans une chambre froide) et agité pendant 20 secondes. Lorsque des temps supérieurs doivent être employés, les tubes sont refroidis dans un mélange de glace et de sel avant d'être de nouveau agités pour une période de 10 à 20 secondes.

Les temps utilisés ont été :

E. coli : 20 secondes

S. fragilis : 30 secondes.

S. cerevisiae : 45 à 60 secondes.

Examinés au microscope, les broyats ainsi obtenus contiennent très peu de cellules intactes (5 à 10 p. cent), des débris cellulaires et principalement du matériel ne présentant aucune structure.

En quelques secondes la poudre de verre se dépose par décantation. Le liquide surnageant est alors centrifugé à 8000 rpm pendant 20 minutes. Le nouveau liquide

surageant obtenu est légèrement coloré en jaune et opalescent. Afin d'éliminer les substrats éventuels et les phosphates (gênant certaines réactions), les extraits bruts sont dialysés pendant 5-6 heures contre plusieurs litres du même tampon ayant servi à leur préparation. Les extraits sont alors congelés et peuvent conserver leur activité pendant au moins deux mois. Après la première décongélation, il est fréquent de constater la présence d'un léger précipité. Celui-ci est éliminé par centrifugation au froid. Les extraits restent ensuite très limpides, même après plusieurs congélations et décongélation successives. C'est donc après la première décongélation que le dosage des protéines est effectué. Ils contiennent 8 à 10 mg de protéines par ml. Pendant les périodes des mesures d'activité enzymatique, les extraits sont conservés dans la glace.

3.8 DOSAGE DES PROTÉINES.

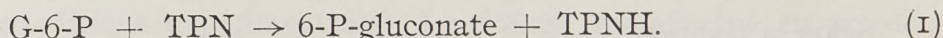
Les protéines ont été déterminées dans les extraits par la méthode de LOWRY et coll. (1951).

3.9 DOSAGES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES.

Les mesures spectrophotométriques ont été effectuées dans un appareil de BECKMAN, modèle DU. Afin de pouvoir utiliser le minimum de produits et d'enzymes, j'ai employé des cuvettes de largeur réduite, mais dont l'épaisseur reste de 1 cm et dont le contenu total est de 1 ml. De plus, une plaque perforée d'un petit trou central et introduite dans le passage du faisceau lumineux, permet de réduire ce faisceau et de le concentrer sur la partie centrale de la cuvette. Le volume introduit dans cette dernière peut ainsi être réduit à 0,6 ml. Sauf mention spéciale, tous les dosages spectrophotométriques ont été effectués dans ce volume.

Dans ces conditions, une variation de 1 division Beckman (0,001 unité de Densité optique) correspond à $0,96 \times 10^{-4}$ μ mole de DPNH ou TPNH.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase. — Selon la réaction :



On mesure, en présence d'un excès de substrat et d'une quantité limitante d'extrait, la vitesse de réduction du TPN (pH 7,5 ; tampon TRIS ; 340 m μ).

Composition du mélange d'incubation :

Glucose-6-phosphate : 0,5 μ mole.

TPN : 0,1 μ mole.

Extrait : quantité limitante.

Tampon TRIS : concentration finale 0,1M, pH 7,5.

Eau : complément à 600 μ l.

Phosphoglucomutase.

Selon la réaction : $\text{G-1-P} \rightleftharpoons \text{G-6-P}$. (2)

En couplant avec la précédente réaction, c'est-à-dire en présence d'un excès de Glucose-6-phosphate déshydrogénase (préparée et cristallisée au laboratoire), de TPN, de glucose-1-phosphate et d'une quantité limitante d'extrait, on mesure la vitesse de réduction du TPN (pH 7,5 ; tampon TRIS ; 340 m μ).

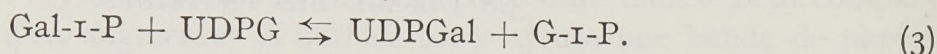
*Composition du mélange d'incubation :*Glucose-1-phosphate : 0,5 μ moleTPN : 0,1 μ moleCystéine neutralisée : 6 μ moles $MgCl_2$: 1 μ moleGlucose-6-phosphate déshydrogénase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l.

Extrait : quantité limitante

Tampon TRIS : concentration finale 0,1 M, pH 7,5

Eau : complément à 600 μ l.*Gal-1-P / G-1-P uridyltransférase :*

Selon la réaction :



En couplant avec les deux enzymes précédentes et en présence d'un excès des deux substrats et de TPN et d'une quantité limitante d'extrait, on mesure la vitesse de réduction du TPN (pH 8, 0 ; tampon glycine : 340 m μ).

*Composition du mélange d'incubation :*Galactose-1-phosphate : 0,2 μ moleUDPG : 0,16 μ moleCystéine neutralisée : 6 μ molesTPN : 0,1 μ mole $MgCl_2$: 1 μ mole

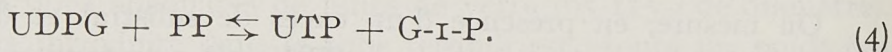
Extrait : quantité limitante.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ lPhosphoglucomutase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l

Tampon glycine : concentration finale 0,1 M, pH 8,0

Eau : complément à 600 μ l.*G-1-P / P-P uridyltransférase*

Selon la réaction :



En couplant avec les réactions (1) et (2), en présence d'un excès des deux substrats et de TPN et d'une quantité limitante d'extrait, on mesure la vitesse de réduction du TPN (pH 8, 0 ; tampon glycine : 340 m μ).

*Composition du mélange d'incubation :*Galactose-1-phosphate : 0,2 μ moleUDPG : 0,16 μ moleTPN : 0,1 μ moleCystéine neutralisée : 6 μ moles $MgCl_2$: 1 μ mole

Extrait : quantité limitante

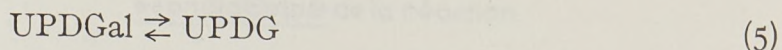
Glucose-6-phosphate déshydrogénase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ lPhosphoglucomutase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l

Tampon glycine : concentration finale 0,1 M, pH 8,0

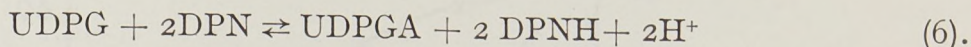
Eau : complément à 600 μ l.

UDPGal-4-épimérase.

Selon la réaction :



On couple avec l'enzyme UDPG-déshydrogénase, effectuant la réaction :



et mesure, en présence d'un excès de substrat et de DPN et d'une quantité limitante d'extrait, la vitesse de réduction du DPN (pH 9,0 ; tampon glycine ; 340 m μ).

Composition du mélange d'incubation :

UDPGal : 0,05 μ mole

DPN : 0,1 μ mole

Extrait : quantité limitante

UDPG déshydrogénase purifiée (10 mg/ml): 30 μ l

Tampon glycine : concentration 0,1 M, pH 9,0

Eau : complément à 600 μ l.

Galactokinase.

Selon la réaction : Galactose + ATP $\rightarrow$ Gal-1-P + ADP (7)

Il apparaît au cours de la réaction un radical phosphate ionisable supplémentaire. Le changement de pH qui en résulte peut être suivi par le virage d'un colorant convenable. J. WAJZER (1949) a mis au point une technique de dosage spectrophotométrique de l'hexokinase, basée sur ce principe, en utilisant comme indicateur le rouge de phénol. Dans des conditions bien définies, la diminution d'absorption à 558 m μ (maximum du pic d'absorption de la forme rouge du colorant) est proportionnelle à la quantité de galactose estérifiée. J'ai appliqué cette technique au dosage de la galactokinase dans les extraits bruts. Les extraits doivent être dialysés pour quelques heures contre l'eau distillée afin d'éliminer les substances minérales provoquant un effet tampon (les protéines ne produisent pas d'effet tampon notable dans nos conditions expérimentales). Le dosage est effectué en présence d'un tampon phosphate très dilué (pH 7,55, 0,002 M), afin de diminuer la vitesse des changements de pH observés.

Composition du mélange d'incubation :

Galactose : 2 μ moles

ATP : 2,7 μ moles

MgCl² : 5 μ moles

Extrait : quantité limitante

Phenol sulfone phtaléine Na, pH 7,55 : 0,02 μ mole

Tampon phosphate : concentration finale, 0,002 M, pH 7,55

Eau : complément à 600 μ l.

Dans tous les cas on s'assure (en augmentant ou en diminuant la quantité d'extrait) que la réaction est effectivement limitée par la quantité d'extrait. Des contrôles sont effectués, parallèlement, en absence de substrat et en absence d'extrait, permettant de tenir compte des erreurs apportées, soit par des traces de substrats présentes dans les extraits, soit de réactions parasites, soit d'impuretés présentes dans certains substrats (UDPG dans l'UDPGal, par exemple).

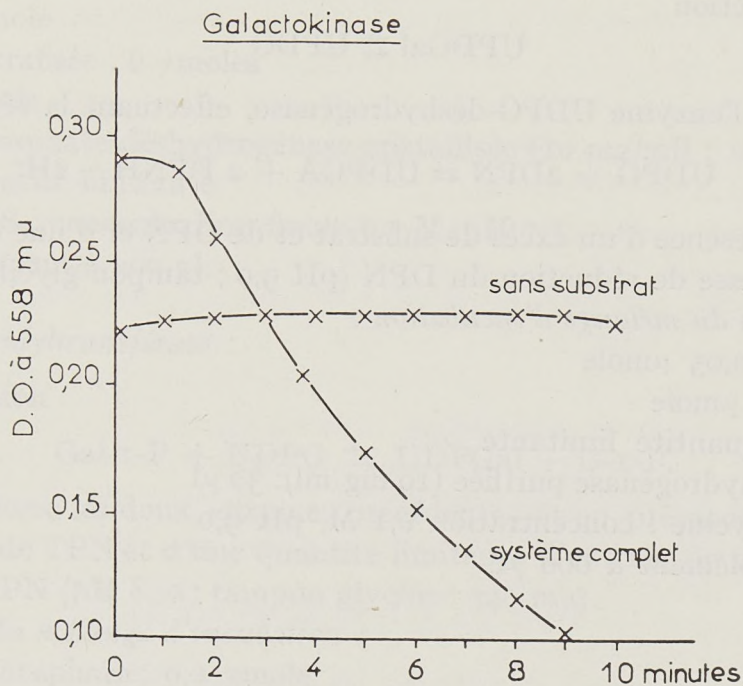


FIG. 2 a

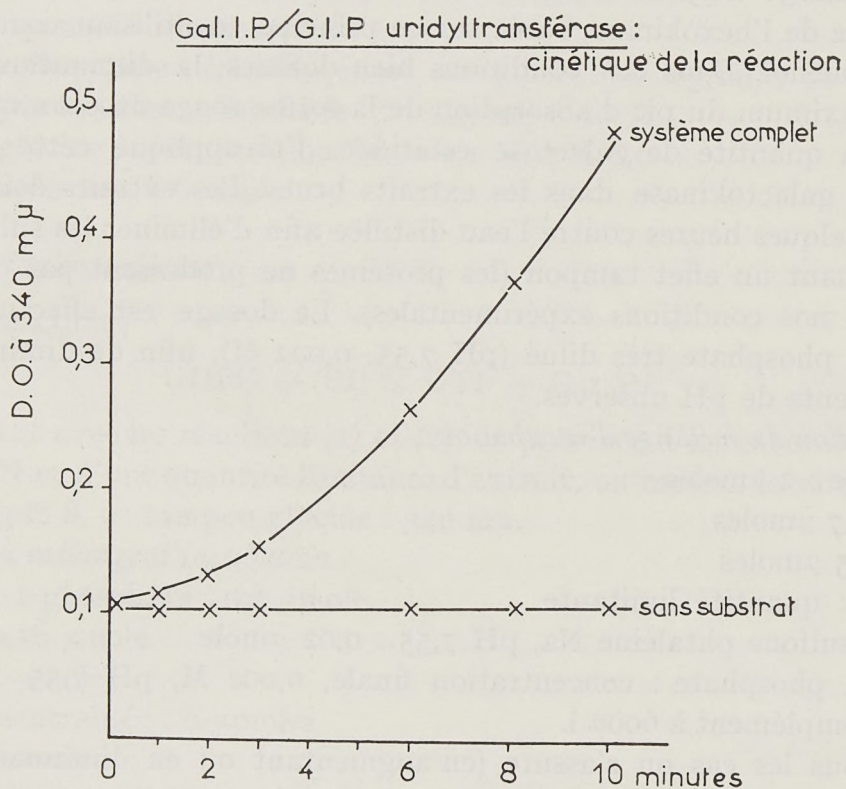


FIG. 2 b.

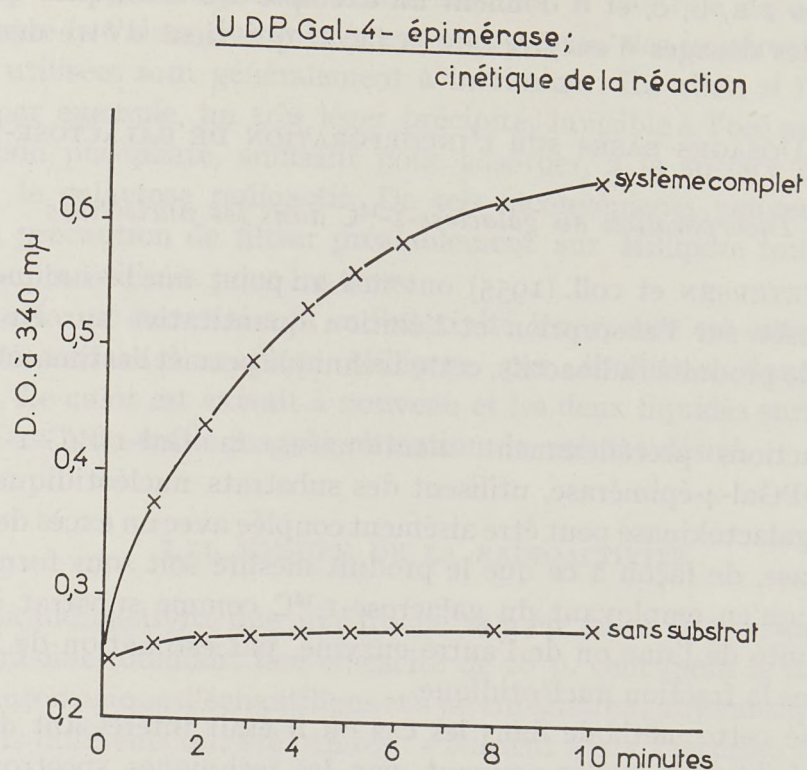


FIG. 2 c.

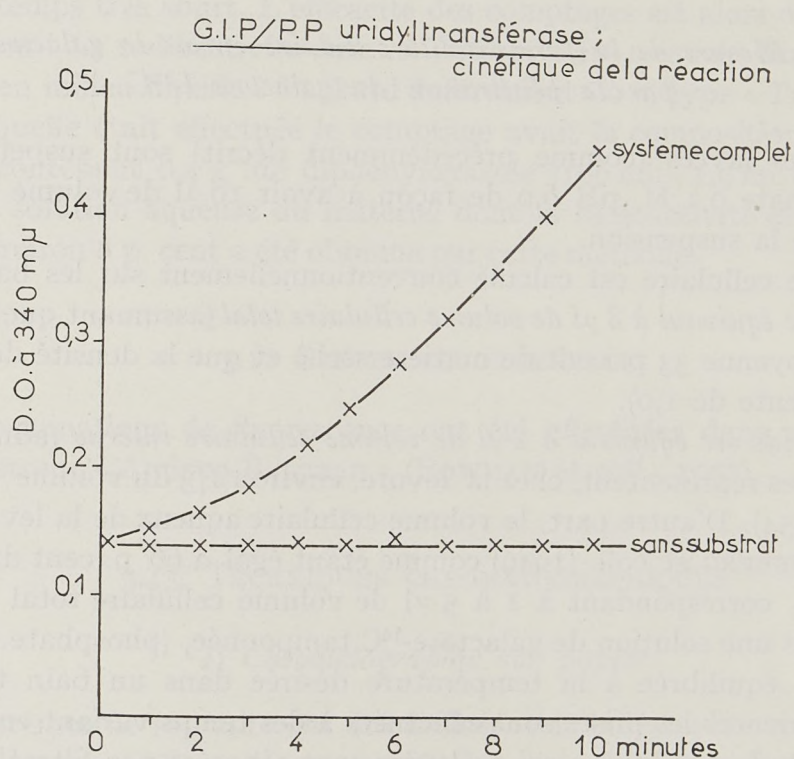


FIG. 2 d.

FIG. 2. — Cinétique des réactions de dosage des enzymes du métabolisme du galactose chez *Saccharomyces cerevisiae* cultivé sur galactose.

Les extraits et les dosages ont été effectués selon les indications portées dans le texte.

Les figures 2 a, b, c, et d donnent un exemple des cinétiques que l'on obtient en effectuant les dosages d'enzymes de la façon qui vient d'être décrite.

3.10 DOSAGES BASÉS SUR L'INCORPORATION DE GALACTOSE-1-¹⁴C

1) *Incorporation du galactose-1-¹⁴C dans les nucléotides*

MUNCH PETERSEN et coll. (1955) ont mis au point une technique de dosage des nucléotides basée sur l'absorption et l'élution quantitative sur Norite. Combinée avec l'emploi de produits radioactifs, cette technique permet l'estimation de 10^{-5} μ mole de nucléotide.

Deux réactions précédemment mentionnées, la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase, utilisent des substrats nucléotidiques. De plus, la réaction de la galactokinase peut être aisément couplée avec un excès de Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, de façon à ce que le produit mesuré soit sous forme d'un nucléotide. On voit qu'en employant du galactose-1-¹⁴C comme substrat initial, on peut mesurer l'activité de l'une ou de l'autre enzyme, par estimation de la radioactivité incorporée dans la fraction nucléotidique.

J'ai utilisé cette méthode dans les cas où il était intéressant de contrôler des activités très faibles ou nulles pouvant, par les techniques spectrophotométriques précédemment décrites, être confondues avec les faibles activités trouvées dans les contrôles.

2) *Mesure de la perméabilité cellulaire envers le galactose par la pénétration du galactose-1-¹⁴C*

Les cellules lavées (comme précédemment décrit) sont suspendues dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0 de façon à avoir 10 μ l de volume cellulaire total dans 0,1 ml de la suspension.

Le volume cellulaire est calculé conventionnellement sur les bases suivantes :

1 mg P. sec équivaut à 3 μ l de volume cellulaire total (assumant que les levures contiennent en moyenne 33 p. cent de matière sèche et que la densité des levures n'est pas très différente de 1,0).

1 mg de poids sec équivaut à 2 μ l de volume cellulaire interne (admettant que les parois cellulaires représentent, chez la levure, environ 1/3 du volume cellulaire total) (cf. WHITE, 1954). D'autre part, le volume cellulaire aqueux de la levure a été déterminé par LINDEBERG et coll. (1949) comme étant égal à 66 p. cent du volume total.

Une prise, correspondant à 1 à 5 μ l de volume cellulaire total est rapidement introduite dans une solution de galactose-¹⁴C tamponnée, (phosphate 0,1 M, pH 6,0), préalablement équilibrée à la température désirée dans un bain thermostatique. Selon les expériences les prises sont effectuées à des temps variant entre 20 secondes et 160 minutes. Les cellules ainsi prélevées sont séparées par filtration ultra-rapide sur membrane « Millipore » (porosité HA) et lavées abondamment sur le filtre avec du tampon phosphate à 0° (cf. BRITTEN et coll., 1955). L'ensemble de l'opération ne dure pas plus de 30 secondes. Un contrôle, effectué avec chaque série de mesures (cellules + mélange radioactif à 0°, immédiatement filtrées et lavées), permet de mesurer la rétention purement mécanique de la membrane filtrante et des cellules.

Afin d'assurer une grande précision aux mesures, le contrôle ne doit pas dépasser 50 cpm. Lorsque la valeur du contrôle est plus grande, des impuretés présentes dans les solutions utilisées sont généralement à incriminer. En effet, si l'eau distillée est carbonatée, par exemple, un très léger précipité, invisible à l'œil nu, peut se former dans le tampon phosphate, suffisant pour adsorber, à la surface de la membrane de filtration, le galactose radioactif. De tels inconvénients peuvent être évités si l'on prend la précaution de filtrer préalablement sur Millipore toutes les solutions qui seront ensuite utilisées pour les tests.

Lorsque cela est nécessaire la radioactivité incorporée est extraite des cellules collectées à la surface d'un filtre Millipore par ébullition dans l'eau pendant cinq minutes. Le culot est extrait à nouveau et les deux liquides surnageants réunis. On concentre au bain-marie jusqu'à obtention du volume désiré.

3.11 MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ

1) ^{14}C : La radioactivité due au carbone 14 a été mesurée avec un compteur à gaz à fenêtre extra-fine, donnant une efficacité de 18 p. cent (pour le carbone), couplée à un passeur automatique d'échantillons et à un enregistreur automatique « précompte ». Deux appareils différents ont été utilisés : « Nuclear » et « Tracerlab ».

Les échantillons solubles étaient étalés sur planchette de cuivre et desséchés par rayonnement infra-rouge. Dans le cas des mesures de perméabilité au galactose- ^{14}C , les filtres « Millipore » étaient collés à l'intérieur d'une planchette et desséchés pendant un temps très court. L'efficacité des comptages est alors de 13 p. 100.

2) *Tritium* : La radioactivité due au Tritium a été mesurée dans un compteur à scintillation en milieu liquide « Packard Instrument Co », type « Tri-Carb ». La solution dans laquelle était effectuée le comptage avait la composition suivante : 8 ml. de toluène (contenant 0,4 g. de diphényloxazole / 100 ml.), 1,9 ml. d'alcool absolu et 0,1 ml. de la solution aqueuse du matériel dont la radioactivité est à mesurer. Une efficacité d'environ 8 p. cent a été obtenue par cette méthode.

3.12 SPECTROFLUOROMÉTRIE

Les déterminations de fluorescence ont été effectuées dans un spectrofluoromètre enregistreur « Aminco-Bowman » (BOWMAN et coll., 1955).

3.13. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1) *Chromatographie sur papier*

Trois systèmes de solvants ont été utilisés, soit indépendamment en chromatographie unidimensionnelle, soit en combinaison en chromatographie bidimensionnelle.

— Butanol — Acide Acétique — Eau (4 : 1 : 15) (cf. PARTRIDGE, 1948)

— Pyridine — Acétate d'éthyle — Eau (2 : 2 : 1) (cf. JERMYN et ISHERWOOD, 1949)

— Phénol saturé d'eau cf. (PARTRIDGE, 1948).

La localisation des sucres réducteurs a été obtenue par la méthode au phtalate acide d'aniline (*cf.* PARTRIDGE, 1949).

La présence de composés, même non réducteurs, a pu être détectée par une modification de la méthode classique au Nitrate d'argent, assurant une sensibilité de l'ordre du μg . (ANET et REYNOLDS, 1953). Tous les composés porteurs d'au moins deux hydroxyles voisins réagissent dans ces conditions.

2) Chromatographie des protéines sur colonne de cellulose-DEAE

La technique de PETERSON et SOBER (1956) et de SOBER et coll. (1956) a été utilisée. Cette technique sera décrite en détail dans la partie expérimentale (voir 4.4).

3.14 DOSAGE CHIMIQUE DU DPN

Selon une légère modification de la méthode utilisant la méthyl-éthyl-cétone (CIOTTI et KAPLAN, 1957).

3.15 DOSAGE DES 2-DÉSOXYSUCRES

Selon la microméthode de WARAVDEKAR et SASLAW (1957).

3.16 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM

Au cours des préparations enzymatiques, la salinité des solutions a été mesurée en employant un « Purity-Meter » (Barnstead Still and Sterilizer Co). Une très faible quantité, 5 à 20 μl , de la solution à mesurer est diluée dans un grand volume d'eau (250 ml à 1 l.) et la conductibilité de la solution est mesurée. Une courbe étalon, préparée à partir de solutions standards de sulfate d'ammonium diluées dans les mêmes conditions, permet l'estimation très précise de la concentration en sulfate d'ammonium des préparations.

IV. — MÉTABOLISME DU GALACTOSE

Au cours de ce chapitre, les voies métaboliques conduisant à l'utilisation catabolique ou anabolique du galactose seront décrites. L'accent sera mis plus particulièrement sur le système le plus répandu, celui qui est présent chez les levures, *E. coli*, et l'homme.

Les différentes enzymes du métabolisme du galactose seront mises en évidence chez la levure, par les méthodes spécifiques décrites dans la partie technique (3). La reproductibilité des résultats sera étudiée, ainsi que la nécessité de rapporter ceux-ci à une enzyme de référence. Les activités des enzymes du métabolisme du galactose seront comparées chez *S. cerevisiae* et *S. fragilis*.

Dans le cadre de l'étude du métabolisme du galactose chez la levure, il a semblé souhaitable de rechercher l'action d'un composé susceptible de se comporter comme un antimétabolite de ce sucre. Il sera montré que le 2-désoxygalactose peut être métabolisé, *in vitro*, par les enzymes du métabolisme du galactose et qu'il agit, *in*

vitro comme *in vivo*, comme un inhibiteur du métabolisme du galactose. Le « lieu » probable de l'inhibition que produit le 2-désoxygalactose, *in vivo*, sera discuté, ainsi que la possibilité d'utiliser les produits de son métabolisme comme inhibiteurs spécifiques des différentes enzymes du métabolisme du galactose.

L'enzyme catalysant la réaction d'épimérisation, l'UDPGal-4-épimérase, enzyme-clé du métabolisme du galactose, a fait l'objet d'une attention spéciale. La purification de cette enzyme, à partir de *S. fragilis*, et l'étude de certaines de ses propriétés, seront décrites en détail. Il sera montré que l'enzyme de levure contient du DPN lié, responsable de la fluorescence et indispensable à l'activité de cette enzyme.

Le mécanisme de la réaction catalysée par l'UDPGal-4-épimérase restant encore obscur, les mécanismes qui ont déjà été proposés seront discutés et un mécanisme nouveau d'oxydo-réduction sera présenté.

4.1 INTRODUCTION

C'est à PASTEUR (1856) que nous devons la découverte du galactose. Étudiant l'action des acides sur le « sucre de lait » (que l'on croyait contenir uniquement du glucose), PASTEUR découvrit que le sucre cristallisant après hydrolyse avait un pouvoir rotatoire et des propriétés fermentaires différentes de celles du glucose. En raison de son origine, il nomma ce nouveau monosaccharide « lactose », ce qui a pu, par la suite, prêter à confusion. Toutefois, les propriétés qu'il en a décrites correspondent tout à fait à celles du galactose ($(\alpha)D = 83^\circ, 2$). PASTEUR ne reconnut pas la présence du glucose dans les eaux-mères et ce fut seulement en 1902 que TANRET découvrit la véritable nature du « sucre de lait » (notre « lactose »).

Propriétés :

Il serait superflu de donner ici un historique de nos connaissances sur la chimie du galactose. Le galactose est un aldohexose, réducteur, soluble dans l'eau, à saveur plus sucrée que le glucose. La forme naturelle est dextrogyre et présente un pouvoir rotatoire $(\alpha)D = + 81^\circ$ (valeur finale).

Structure :

La structure attribuée au galactose comme étant la plus probable est représentée dans la figure 3.

Dans cette formule, représentant la structure « en chaise », les liaisons horizontales sont dites équatoriales, c'est-à-dire parallèles au plan ; les liaisons verticales sont dites axiales (les liaisons en trait pointillé ont été prolongées pour la clarté du dessin).

Lorsqu'on construit un modèle moléculaire de ce composé, on s'aperçoit que la plupart des liaisons devraient être en réalité inclinées, non seulement dans le plan, mais aussi dans l'espace. La figure 4 représente le modèle moléculaire « en chaise » du squelette pyranique d'un aldose (selon PIGMAN, 1948). Le noyau en trait accentué est celui de l'oxygène.

Nous verrons plus loin que ces considérations deviennent très importantes lorsqu'il s'agit d'imaginer d'un point de vue stérique les mécanismes possibles d'une réaction enzymatique.

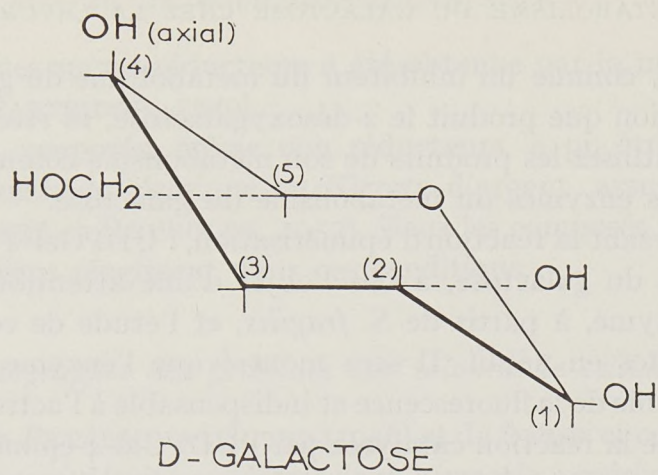


FIG. 3. — *Formule développée du D(+) galactose.*
Les liaisons en traits pointillés ont été prolongées pour la clarté du dessin.

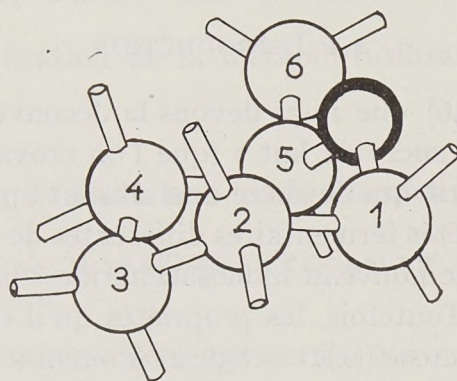
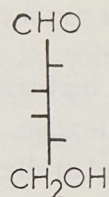
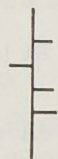


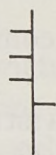
FIG. 4. — *Formule spatiale d'un hexose*
Selon PIGMAN, 1948 (p. 54).



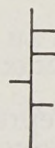
D (+) galactose



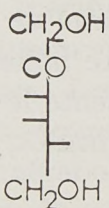
D-glucose



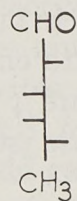
D-talose



D-gulose



D-tagatose



D-fucose

FIG. 5. — *Formules développées de quelques glucides présentant des relations de structure avec le D-galactose.*

Répartition :

On sait que le galactose entre dans la composition de plusieurs composés biologiques importants ; chez les mammifères ce sont les galactolipides du cerveau, le lactose du lait et les mucopolysaccharides des groupes sanguins ; chez les micro-organismes, les polysaccharides de la membrane ; chez les végétaux, les galactanes, le raffinose, le stacchyose et des glycosides, tels que la digitonine, etc.

Origine biochimique :

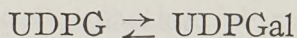
Les organismes qui viennent d'être mentionnés sont capables d'utiliser le galactose pour leur croissance, mais on n'en connaît, à l'heure actuelle, aucun qui requiert ce sucre pour sa croissance. Il est donc évident qu'il existe chez tous les organismes contenant du galactose, d'une part, une voie métabolique qui permet de le synthétiser, à partir des produits du métabolisme général, et, d'autre part, une voie métabolique qui permet l'utilisation de ce sucre.

Si l'on considère les formules (figure 5), on voit qu'il existe trois aldohexoses qui ne diffèrent du D-galactose que par l'orientation d'un seul hydroxyle : ce sont le D-glucose (4^{ème} hydroxyle), le D-talose (2^{ème} hydroxyle) et le D-gulose (3^{ème} hydroxyle), tous trois « épimères » du galactose. De plus, le D-tagatose est le ceto-hexose et le D-fucose le méthyl-pentose, correspondant au D-galactose.

Étant donné que le talose, le gulose, le D-tagatose et le D-fucose sont, soit des sucres rares, soit des sucres non-naturels, l'hypothèse la plus simple consistait à admettre que l'épimérisation s'effectue à partir de l'hexose le plus répandu dans la nature : le glucose.

Mise en évidence d'un mécanisme d'épimérisation :

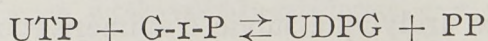
C'est à LELOIR et à ses collaborateurs que revient le mérite d'avoir isolé de la levure un composé nucléotidique important, l'uridine-diphospho-glucose (CAPUTTO et coll., 1950) et d'avoir montré qu'une enzyme (présente dans les levures après croissance sur galactose) catalyse la réaction d'équilibre suivante :

*Activation :*

L'épimérisation du glucose en galactose se produit donc lorsque ces sucres sont liés à un nucléotide uridylique. Jusqu'à présent, cette épimérisation n'a été trouvée pour aucun autre composé du galactose. La formation d'un dérivé nucléotidique (ici UPD-sucre) semble correspondre à un mécanisme dit d'« activation », comme dans beaucoup d'autres cas découverts depuis : GDP-sucres (*cf.* CABIB et coll., 1953, 1954 ; RENAMUS et coll., 1958 ; GINSBURG, 1958), AMP-amino-acides (*cf.* HOAGLAND, 1955), CDP-choline (*cf.* KENNEDY et WEISS, 1954). etc... En d'autres termes, c'est le fait de se trouver liée à un reste nucléotidique qui rend la molécule capable de subir certaines transformations chimiques qu'elle ne peut subir à l'état libre.

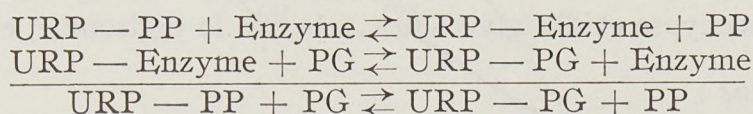
Origine de l'UDPG :

KALCKAR et coll. ont montré que l'UDPG est formé au cours de la réaction d'équilibre suivante (*cf.* KALCKAR et coll., 1952 ; MUNCH-PETERSEN et coll., 1953 ; KALCKAR et coll., 1953 ; MUNCH-PETERSEN et coll., 1955) :



L'enzyme catalysant cette réaction semble être universellement répandue. MUNCH-PETERSEN (1954) a montré à l'aide de pyrophosphate radioactif que le mécanisme de cette réaction consiste en un transfert du groupement uridyle entre le pyrophosphate et le glucose-1-phosphate.

La réaction peut être formulée de la façon suivante :



Si l'on considère l'équation ci-dessus de la droite vers la gauche, la réaction correspond à une pyrophosphorolyse de l'UDPG, ce qui justifie le nom d'UDPG-pyrophosphorylase que les auteurs précédemment cités lui ont attribué. Comme nous le

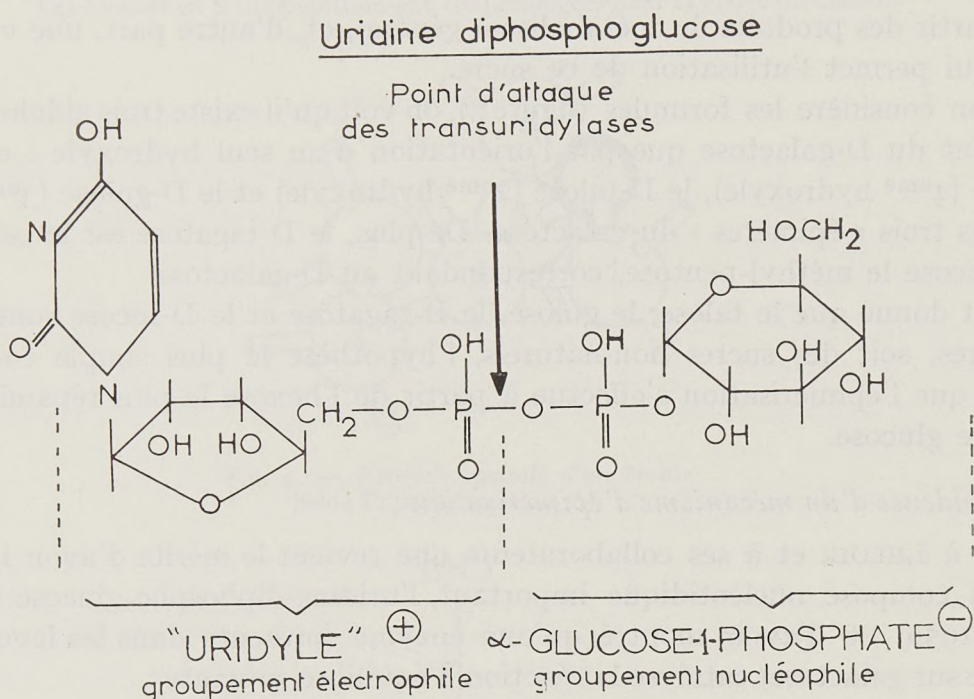


FIG. 6. — Uridine-diphosphoglucose.

verrons plus loin, il existe plusieurs enzymes, de spécificités différentes, mais dont le mécanisme d'action correspond également à un transfert de groupement uridyl-entre deux composés nucléophiles. C'est pourquoi j'adopterai ici le nom général d'uridyl-transférase pour cette catégorie d'enzymes, en le faisant précéder, dans chaque cas particulier, du nom des deux composés accepteurs du groupement Uridyl-(groupement électrophile). J'appellerai donc l'enzyme précédente la G-1-P/PP uridyl transférase (*cf.* KALCKAR et H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1959).

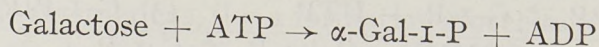
La figure 6 représente à la fois la formule développée de l'uridine diphosphoglucose et le point d'attaque des uridyl-transférases. Le glucose-1-phosphate peut être substitué dans cette formule au pyrophosphate, au galactose-1-phosphate, à différents pentoses phosphates, etc. Le transfert de chacun de ces sucres phosphorylés est catalysé par une enzyme spécifique.

Voies métaboliques conduisant à l'utilisation du galactose :

Je décrirai ici la voie métabolique la plus répandue : phosphorylation, incorporation dans un nucléotide uridylique suivie d'épimérisation. Une autre voie méta-

bolique correspondant à une oxydation directe, mise en évidence par DELEY et DOUDOROFF (1957) n'a jusqu'à présent été trouvée que chez *Pseudomonas saccharophila* ⁽¹⁾.

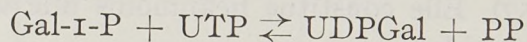
1) *Phosphorylation*. — On sait depuis longtemps (KOSTERLITZ, 1943) que le galactose est phosphorylé par les tissus animaux, en position 1, fournissant ainsi un ester non-réducteur, analogue à l'ester de CORI. La réaction d'estérification est catalysée par une kinase spécifique, la galactokinase, isolée de la levure par TRUCCO et coll., (1948). La réaction, pratiquement irréversible, est la suivante :



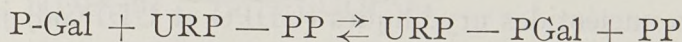
Cette réaction a été retrouvée chez *E. coli* (KURAHASHI, 1957) et chez les plantes (HASSID et coll., 1956). Il est intéressant de remarquer que le galactose-1-phosphate est apparemment le seul ester phosphorylé du galactose. L'existence transitoire du galactose-1-6-diphosphate a toutefois été postulée (KLENOW et EMBERLAND, 1955 ; GINSBURG et NEUFELD, 1957).

2) *Incorporation sous forme nucléotidique*. — Connaissant l'existence de l'UDPGal-4-épipimérase, précédemment mentionnée, on pouvait postuler l'existence d'une réaction permettant la transformation du galactose-1-phosphate en UDP-galactose, lequel pourrait ensuite être transformé en UDP-glucose. Cette incorporation peut se faire de deux manières :

a) *Par la voie d'une Gal-1-P/PP uridyltransférase*, parallèle à la réaction qui assure la biosynthèse de l'UDPG ($\text{G-1-P} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDPG} + \text{PP}$). La réaction est la suivante :

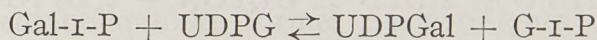


qui peut s'écrire également :

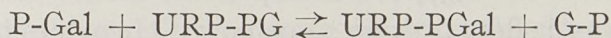


Cette réaction a été mise en évidence chez les plantes (NEUFELD et Coll. 1957). Sa présence a pu également être décelée chez l'homme (ISSELBACHER, 1957). Toutefois, alors que chez les plantes cette réaction fait partie de la principale voie métabolique de l'utilisation du galactose, elle est presque inexistante chez l'homme, et absente chez la levure ou les microorganismes.

b) *Par la voie d'une Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase*. — Cette réaction a pour la première fois été mise en évidence par KALCKAR et coll. (1953), et étudiée par MUNCH-PETERSEN et coll. (1955). Au cours de la réaction catalysée par cette enzyme, le groupement uridyl- se trouve spécifiquement transféré du glucose-1-phosphate au galactose-1-phosphate :



ou, sous une autre forme :

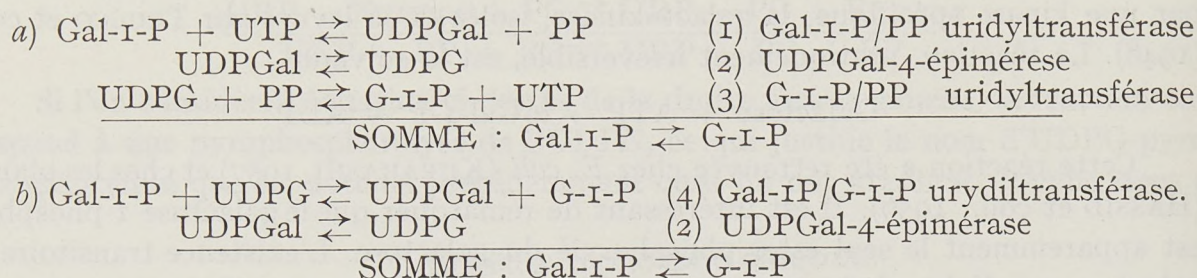


Cette réaction, découverte chez la levure, a été retrouvée dans les hématies (KALCKAR et coll., 1956) et *E. coli* (KURAHASHI et ANDERSON, 1958).

(1) Les principales étapes de cette dégradation sont les suivantes : D-galactose $\xrightarrow{\text{DPN}}$ D-galactono-lactone $\xrightarrow{\text{ATP}}$ D-galactonate $\longrightarrow$ 2-céto-3-désoxy-galactonate $\longrightarrow$ pyruvate + D-glycéraldéhyde-3 phosphate.

3) *Épimérisation*. — L'UDPGal-4-épimérase isolée de *Saccharomyces fragilis* conduit à une valeur d'équilibre dans laquelle 25 p. 100 sont représentés par l'UDPGal, 75 p. 100 par l'UDPG (LELOIR, 1951a). La même valeur d'équilibre a été retrouvée lorsque la même enzyme est extraite de foie de mammifère (MAXWELL, 1957).

4) *Équations générales*. — Les équations précédemment décrites peuvent être résumées ainsi :



Rôles anaboliques du l'UDPG et de l'UDPGal :

Ces deux composés jouent un rôle très important comme donateurs de groupement galactosyl- ou glycosyl- dans la synthèse de di- et de polysaccharides, simples ou complexes. Les principales réactions actuellement connues sont les suivantes :

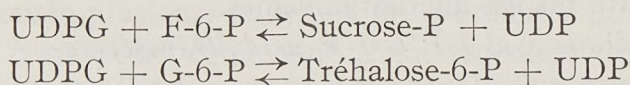
1) *Biosynthèse du lactose* (GANDER et coll., 1956)



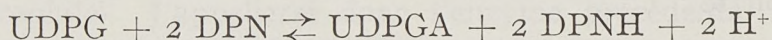
Cette réaction n'est probablement pas la seule qui conduise à la formation du lactose (WOOD et coll., 1957). Elle constitue néanmoins une voie importante pour la biosynthèse de ce disaccharide.

2) *Biosynthèse des galactolipides*. — Il existe à l'heure actuelle des indications selon lesquelles les nucléotides uridyliques (UDPG et UDPGal) joueraient tous deux un rôle important dans la biosynthèse des galactolipides par des extraits de cerveau.

3) *Biosynthèse du sucrose et du tréhalose* : — Comme LELOIR et coll. l'ont montré (cf. LELOIR et CABIB, 1953 ; CARDINI et LELOIR, 1955 ; LELOIR et coll., 1955) le sucrose et le tréhalose sont synthétisés à partir de l'UDPG au cours de réactions parallèles :



4) *Biosynthèse de l'acide UDP glucuronique*. — L'acide UDP glucuronique est formé au cours de la réaction suivante :



Cette réaction a été mise en évidence et l'enzyme purifiée à partir de foie de mammifère par STROMINGER et coll. (1957). On sait que cet acide est très important, en particulier dans les processus de détoxication, transport d'hormones telles que la cortisone, thyroxine, etc. (cf. ISSELBACHER et AXELROD, 1955 ; SCHMID et coll., 1957 ; DUTTON et STOREY, 1951 ; SMITH et MILLS, 1954 ; STOREY et DUTTON, 1955). Au cours de ces réactions, l'acide glucuronique se conjugue avec les différents accepteurs, libérant l'UDP, comme dans les réactions précédentes.

Dans les réactions cataboliques les nucléotides n'étaient utilisés qu'en quantités catalytiques. Au contraire, au cours des réactions anaboliques qui viennent d'être

mentionnées, on consomme une molécule d'UDPG par molécule de l'un quelconque des di-saccharides formés. Puisque la synthèse de chaque molécule d'UDPG requiert un molécule d'UTP et que son utilisation libère un molécule d'UDP, il y a donc chute d'énergie, probablement du même ordre de grandeur que celle qui correspond à la transformation de l'ATP en ADP. C'est pourquoi la réversibilité de ces réactions anaboliques est peu probable du point de vue thermodynamique.

L'ensemble des réactions qui viennent d'être décrites dans cette introduction, concernant la levure *E. coli* et l'homme, peut être résumé dans le schéma de la figure 7,

On voit que, dans le premier cas, il y a formation stoechiométrique de l'UDPGal, puis de l'UDPG, à partir du Galactose-1-phosphate. L'UDPG et le pyrophosphate, résultant de ces deux réactions, régénèrent — réaction (3) — l'UTP nécessaire à la réaction (1) ; dans le second cas, l'UDPG nécessaire à l'amorçage de la réaction (4) est continuellement reformé par la réaction (2), (voir précédemment, « équations générales »).

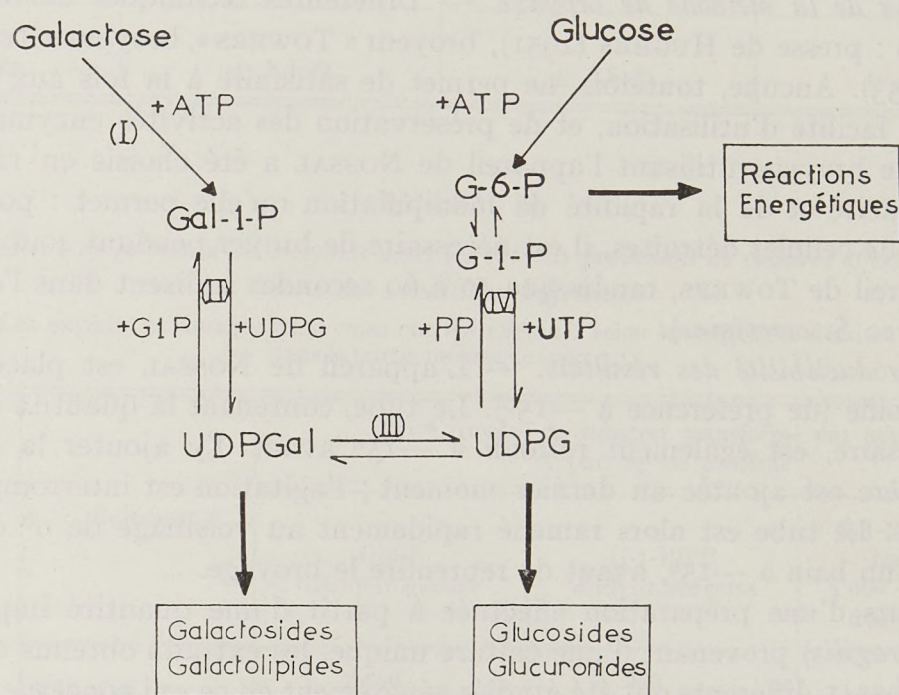


FIG. 7. — Métabolisme du galactose en relation avec celui du glucose, chez la levure, *E. coli*, et l'homme.

Il en résulte que ces deux mécanismes conduisent finalement à la transformation totale du Galactose-1-phosphate en Glucose-1-phosphate, produit métabolique immédiatement utilisable par la cellule. On peut donc considérer qu'au cours de cette transformation catabolique les formes nucléotidiques du glucose (UDPG) ou du galactose (UDPGal), bien que constituant le support réel de l'inversion, n'agissent qu'en tant que coenzymes. Les mécanismes (a) et (b) ne semblent pas coexister au sein d'un même organisme. Le mécanisme (a) étant celui trouvé chez les plantes, tandis que le mécanisme (b) existe chez la levure, *E. coli* et l'homme. Cependant, il est intéressant de remarquer que le mécanisme (a) doit potentiellement exister chez l'homme. En effet, comme ISSELBACHER vient récemment de le montrer (1957), certains des individus chez lesquels l'enzyme (4) est absente par suite d'une mutation, peuvent éventuellement développer une enzyme (1) suffisamment active pour permettre une tolérance accrue envers le galactose.

4.2. — MISE EN ÉVIDENCE DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ LA LEVURE

Variation de la teneur en enzymes et reproductibilité des broyats :

Comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ce chapitre, les trois enzymes assurant le métabolisme du galactose : galactokinase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, UDPGal-4-épimérase, avaient déjà été caractérisées chez *S. fragilis* (cf. LELOIR, 1951 ; KALCKAR et coll., 1953). Toutefois, les méthodes employées (généralement levures séchées, puis autolysées) ne permettent pas d'avoir une reproductibilité suffisante pour effectuer une étude comparative de la biosynthèse de ces différentes enzymes.

J'ai donc cherché à mettre au point une technique de broyage de la levure (cf. 3.7) suffisamment reproductible et permettant de préserver, autant que possible les activités des enzymes étudiées :

1) *Choix de la méthode de broyage.* — Différentes techniques de broyage ont été essayées : presse de HUGHES (1951), broyeur « TOWERS », broyeur ultra-rapide de NOSSAL (1953). Aucune, toutefois, ne permet de satisfaire à la fois aux critères de rapidité, de facilité d'utilisation, et de préservation des activités enzymatiques. La technique de broyage utilisant l'appareil de NOSSAL a été choisie en raison de sa grande efficacité et de la rapidité de manipulation qu'elle permet : pour obtenir à 80 p. 100 de cellules détruites, il est nécessaire de broyer pendant 40 à 60 minutes dans l'appareil de TOWERS, tandis que 40 à 60 secondes suffisent dans l'appareil de NOSSAL (avec *S. cerevisiae*).

2) *Reproductibilité des résultats.* — L'appareil de NOSSAL est placé dans une chambre froide (de préférence à -15°). Le tube, contenant la quantité de billes de verre nécessaire, est également refroidi à -15° avant d'y ajouter la suspension. Cette dernière est ajoutée au dernier moment ; l'agitation est interrompue chaque 20 secondes. Le tube est alors ramené rapidement au voisinage de 0° en le plongeant dans un bain à -15° , avant de reprendre le broyage.

Au cours d'une préparation effectuée à partir d'une quantité importante de levure (*S. fragilis*) provenant d'une culture unique, les extraits obtenus dans quatre tubes de NOSSAL, différents ont été étudiés séparément en ce qui concerne leur teneur en UDPGal-4-épimérase et en G-1-P/PP uridyltransférase. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau I.

On voit que la reproductibilité des activités enzymatiques trouvées dans les extraits est très satisfaisante. De plus, si l'on considère les rapports des deux activités (activité d'UDPGal-4-épimérase correspondant à 1 000 unités de G-1-P/PP uridyltransférase,) on constate que leur variation est inférieure à 25 p. 100.

3) *Choix d'une enzyme de référence.* — Le volume de la suspension introduite dans le tube de broyage est un facteur critique. En effet, bien que les rendements en protéines restent sensiblement les mêmes, quel que soit le volume utilisé (8 à 12 mg de protéines par ml d'extrait brut, quand les volumes de suspension varient entre 2 et 9 ml), les activités spécifiques obtenues décroissent très rapidement avec le volume de suspension introduite. Ceci peut être attribué à l'échauffement plus grand et à la formation de mousse que l'on constate lorsque les tubes ne sont pas pleins.

La quantité de cellules dont on disposait n'ayant pas toujours permis d'avoir le volume optimum de suspension cellulaire, il a été jugé nécessaire d'exprimer les

TABLEAU I

Reproductibilité des broyats

Les extraits et dosages d'enzymes ont été effectués selon les méthodes décrites dans la partie technique (voir 3.).

Tube	10 ⁻⁴ μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine		
	UDPGal-4-épimérase	G-1-P/PP uridyltransférase	UDPGal-4-épimérase/ 1 000 U. de G-1-P/PP uridyltransférase
1	385	2 400	160
2	340	2 080	163
3	365	2 320	157
4	400	2 450	163
Moyenne	372	2 312	161
Déviati on par rapport à la moyenne.....	$\pm 8,1 \%$	$\pm 5,8 \%$	$\pm 1,9 \%$

TABLEAU 2

Variation de la teneur en enzymes dans les extraits provenant de cultures effectuées dans des conditions différentes

Les extraits et dosages d'enzymes ont été effectués selon les méthodes décrites dans la partie technique (voir 3.).

Précultures	Cultures	10 ⁻⁴ μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine		
		G-6-P déshydrogénase	G-1-P/PP uridyltransférase	G-1-P /PP uridyl transférase/ 1 000 U. de G-6-P déshydrogénase
AE Glu	ANA Gal	2 140	390	182
AE Glu	ANA Gal	1 540	280	182
AE Glu	ANA Gal + Glu	2 310	495 ⁽¹⁾	214
AE Gal	ANA Gal	2 010	465	231 ⁽¹⁾
		2 500 ⁽¹⁾	482	193
		1 950	396	203
		1 380	280	202
		1 780	374	210
		2 340	445	190
		1 560	325	208
Moyenne générale		1 951	393	201
Déviati on		$\pm 28 \%$	$\pm 27 \%$	$\pm 12 \%$
Moyenne AE		1 983	400	202
Moyenne ANA		1 902	383	200
Moyenne galactose		2 075	418	201
Moyenne glucose		1 765	356	202

⁽¹⁾ Les valeurs en italiques sont les plus élevées que les méthodes employées aient permis d'obtenir.

résultats, non seulement en unités d'activité par mg de protéines, mais également par rapport à une enzyme prise comme référence.

Le choix de cette enzyme est assez délicat : sa concentration doit varier le moins possible en fonction du mode de culture ou de l'état physiologique des cellules ; elle doit être suffisamment stable dans les conditions utilisées pour la préparation de l'extrait, et pouvoir être testée d'une manière spécifique et rapide.

Parmi les enzymes qui se trouvent en connection métabolique avec les enzymes du métabolisme du galactose, et font cependant partie de l'équipement enzymatique constant de la cellule, trois répondent, à priori, à ces critères : la G-1-P/PP uridyl-

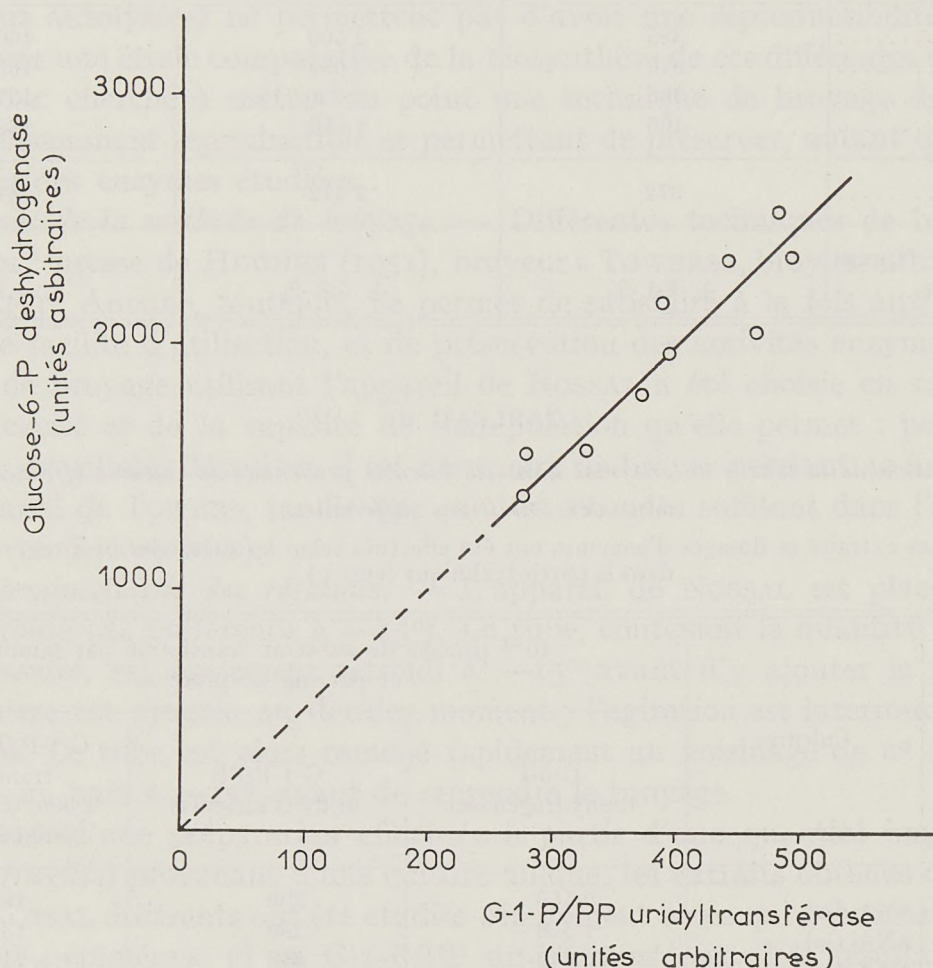


FIG. 8. — Relation entre le contenu des extraits en glucose-6-phosphate déshydrogénase et en glucose-1-phosphate/pyrophosphate uridyltransférase.

transférase, la phosphoglucomutase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Toutefois, comme je le montrerai plus loin (6.9), la phosphoglucomutase ne peut être utilisée comme enzyme de référence, car son activité s'accroît lorsque les cellules possèdent les enzymes du métabolisme du galactose.

Afin de juger des variations maxima d'activité des deux autres enzymes, j'ai comparé les activités d'extraits effectués dans les conditions standard (8 ml-8 g de billes de verre), mais provenant de cultures indépendantes et obtenues dans des conditions différentes (aérobiose, anaérobiose, glucose, galactose). La souche utilisée ici a été *S. cerevisiae* CH-1 ; les conditions de culture sont celles qui ont été décrites dans la partie technique (voir 3.5). Les résultats d'une telle comparaison sont consignés dans le tableau 2.

On voit que les différences d'un extrait à l'autre sont beaucoup plus grandes ici que les résultats présentés dans le tableau 1 : $\pm 27-28$ p. 100 au lieu de $\pm 6-8$ p. 100. Il faut donc penser qu'il existe des différences réelles entre les extraits. Le fait que les différences soient seulement diminuées et non abolies lorsqu'on fait le rapport entre les deux activités montre que les variations accidentelles ou systématiques des deux enzymes vont dans le même sens, sans être strictement parallèles, toutefois. Cette corrélation est exprimée clairement dans le diagramme de la figure 8, où sont portées les activités d'une enzyme en fonction de l'autre. De plus, ces différences ne semblent pas pouvoir être mises en relation avec des conditions expérimentales définies telles que aérobose/anaérobie, glucose/galactose. En effet, les valeurs obtenues dans ces moyennes partielles ne diffèrent pas significativement de la moyenne générale.

Puisque les variations de la teneur en chacune des deux enzymes G-6-P déshydrogénase et G-1-P/PP uridyltransférase sont semblables (27 et 28 p. 100) l'une ou l'autre peuvent indifféremment être utilisées comme enzyme de référence. GALZY et SLONIMSKI (1957) ont également constaté que la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase est l'enzyme la moins sujette à variation, chez la levure.

Dans les expériences effectuées au début de ce travail, la G-6-P déshydrogénase n'ayant pas été déterminée d'une manière systématique, certains résultats ne pourront être rapportés qu'à une activité constante (1 000 unités) de G-1-P/PP uridyltransférase. Chaque fois que cela sera possible, les activités seront rapportées à une activité constante de G-6-P déshydrogénase.

Activité des enzymes du métabolisme du galactose chez la levure.

1) *Comparaison des activités chez S. fragilis et S. cerevisiae.* — Pour cette étude les cellules ont été cultivées sur milieu 3S galactose et les activités des enzymes estimées par les méthodes précédemment décrites (voir 3.4, 3.5 et 3.9).

Le tableau 3 donne les valeurs moyennes des activités brutes et rapportées à 1 000 unités de G-1-P/PP uridyltransférase.

TABLEAU 3

Comparaison entre S. fragilis et S. cerevisiae après culture sur galactose

	10 ⁻⁴ μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine			
	<i>S. fragilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. fragilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
			Pour 1 000 U. de G-1-P/PP uridyltransférase	
Galactokinase	1 480	38	725	96
Gal-1-P/G-1-P uridyltransf.	57 800	178	28 200	450
UPDGal-4-épimérase	612	97	300	246
G-1-P/PP uridyltransf. . . .	2 040	398	(1 000)	(1 000)

On voit que les résultats obtenus à partir de ces deux espèces de levure sont très différents. Ceci peut être imputé à des causes diverses. (Résistance très différente des membranes, légères différences dans la structure des enzymes impliquées

selon l'organisme considéré, etc.) ou refléter des niveaux intracellulaires réellement différents.

On voit que pour les deux souches, la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase est la plus active des trois enzymes du métabolisme du galactose, la différence étant toutefois beaucoup plus importante chez *S. fragilis* (40 fois la galactokinase) que chez *S. cerevisiae* (4 fois la galactokinase). La moins active des trois enzymes est l'UDPGal-4-épimérase chez *S. fragilis* et la galactokinase chez *S. cerevisiae*.

2) *Choix de la souche à employer.* — Le fait qu'une plus grande activité enzymatique puisse être obtenue à partir de *S. fragilis* rend cette souche très intéressante lorsqu'il s'agit d'en extraire l'une des enzymes du métabolisme du galactose. C'est pourquoi je l'ai utilisée pour la préparation de l'UDPGal-4-épimérase, par exemple. Mais puisqu'on ne connaît, à l'heure actuelle, de mutants que chez *S. cerevisiae*, j'ai utilisé cette dernière espèce pour les études concernant le contrôle héréditaire et le caractère adaptatif des enzymes du galactose.

4.3. — MÉTABOLISME DU 2-DÉSOXY-D-GALACTOSE

Introduction.

C'est un fait connu que le 2-désoxy-glucose est très rapidement phosphorylé par l'hexokinase (CRAMER et WOODWARD, 1952), et que c'est vraisemblablement le 2-désoxyglucose-6-phosphate accumulé qui est responsable du rôle inhibiteur que cet analogue du glucose exerce sur la fermentation chez les levures (CRAMER et WOODWARD, 1952) et sur la glycolyse de différents tissus (WOODWARD et HUDSON, 1954).

En rapport avec le métabolisme du galactose chez les levures, il était intéressant de voir quel était le sort métabolique du 2-désoxygalactose. Est-il phosphorylé? Est-il métabolisé ultérieurement? Se comporte-t-il comme un inhibiteur de l'une ou de plusieurs des enzymes du métabolisme du galactose? En effet, l'utilisation de ce désoxysucre ou de ses dérivés pourrait être un outil précieux dans l'étude du mécanisme des réactions du métabolisme du galactose et plus particulièrement de celui de l'UDPGal-4-épimérase.

Métabolisme in vitro.

Au moment où j'ai effectué ces expériences, la quantité de 2-désoxygalactose dont je disposais était trop limitée pour entreprendre une détermination chimique des produits du métabolisme de ce composé. J'ai donc dû me limiter à des essais spectrophotométriques. Cependant, étant donné la spécificité des réactions employées, ces essais permettent de se faire une idée assez exacte des transformations métaboliques du 2-désoxygalactose.

Ces essais ont été effectués avec du 2-désoxygalactose synthétisé par le Dr. LANDAU (N. I. H., Bethesda, USA), ne contenant aucune impureté décelable par chromatographie sur papier.

Je décrirai ici une expérience type. Trois expériences semblables ont été effectuées et ont donné des résultats concordants. Ces expériences sont fondées sur les mêmes principes et les mêmes techniques que ceux qui ont été exposés dans la partie

technique (voir 3.6 et 3.9). La figure 9 donne le schéma des opérations successives effectuées à partir du 2-désoxy-galactose.

1) *Phosphorylation du 2-désoxygalactose sous l'influence de la galactokinase.*

Le mélange d'incubation (1) est le suivant :

Désoxygalactose : 50 μ moles

ATP : 44 μ moles

FNa : 75 μ moles

MgCl₂ : 50 μ moles

Cystéine (neutralisée) : 38 μ moles

Extrait purifié *E. coli* 3096 (Gal-1-P/G-1-Puridyltransférase négatif) : 1 ml

Tampon TRIS, pH 7,5, 1 M : 0,4 ml

Eau distillée, complément à 3,30 ml

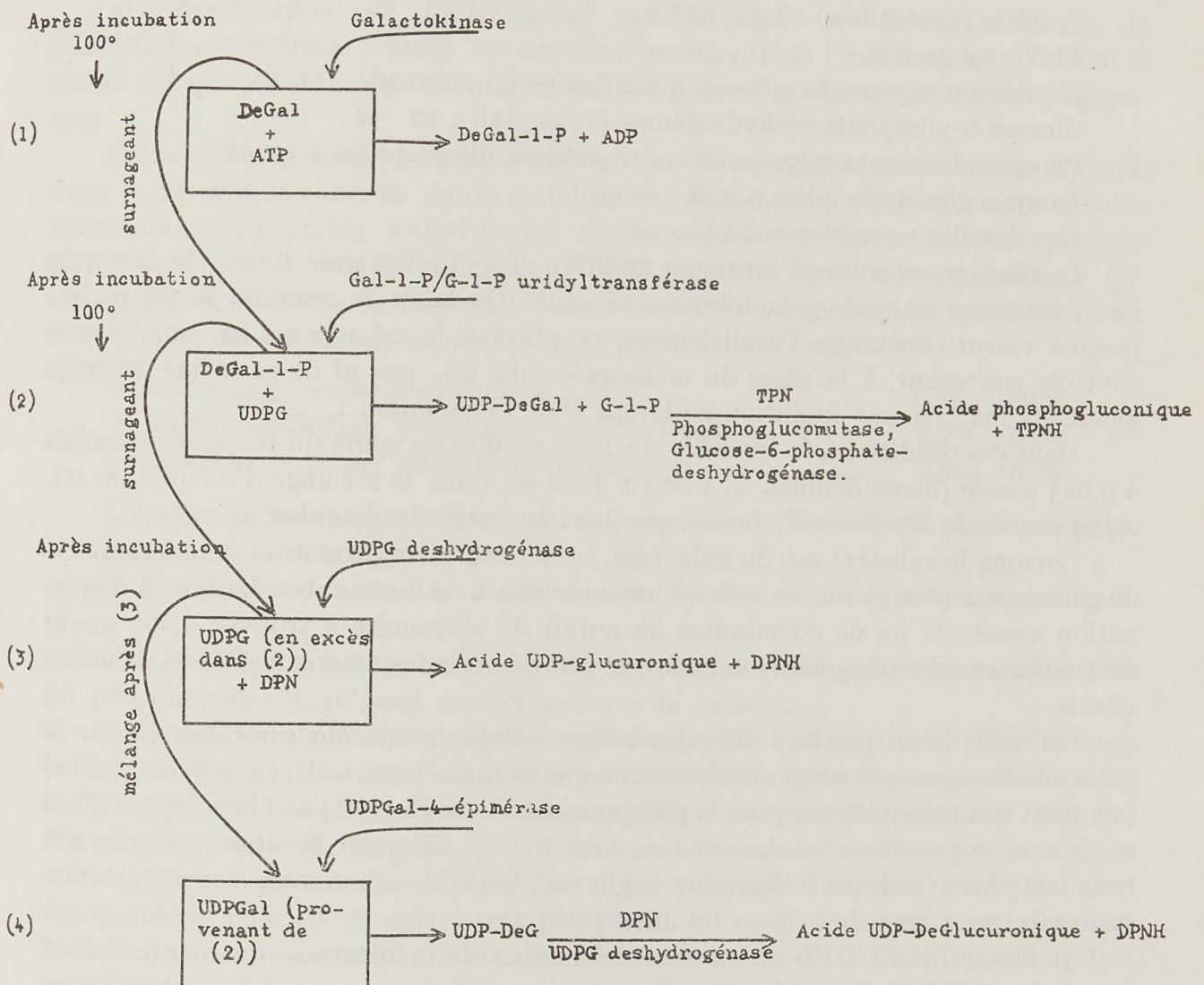


FIG. 9. — Schéma des réactions enzymatiques effectuées *in vitro* à partir du 2-désoxy-D-galactose. Le TPNH ou le DPNH formés au cours de ces réactions ont été mesurés spectrophotométriquement.

L'incubation a été faite à 37°. Après 90 minutes, le mélange a été porté à ébullition pendant trois minutes et centrifugé. Le liquide surnageant est analysé pour son contenu en désoxygalactose-1-phosphate.

2) *Incorporation du 2-désoxygalactose-1-phosphate sous forme d'un nucléotide uridylique.* — (Sous l'influence de la Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase) : Cette étape permet de déterminer la quantité de 2-désoxy-galactose-1-phosphate qui s'est formée au cours de l'incubation précédente, et de savoir si l'enzyme peut effectuer le transfert entre De-Gal-1-P et G-1-P, et transformer quantitativement le désoxygalactose-1-phosphate en uridinediphospho-désoxygalactose.

Afin d'éviter tout apport de galactokinase (qui conduirait à la transformation ultérieure du désoxygalactose demeurant dans le mélange), j'ai utilisé ici un extrait dialysé de levures galactokinase-négatives, contenant la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase.

La transformation a été suivie spectrophotométriquement sur le mélange réactionnel (2) suivant :

UDPG : 0,075 μ mole

Cystéine (neutralisée) : 2,5 μ moles

TPN : 0,1 μ mole

Liquide surnageant du mélange d'incubation (1) : 100 μ l

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (10 mg/ml) : 10 μ l

Phosphoglucomutase (préparation cristallisée, diluée 4 fois), : 10 μ l

Tampon glycolle, pH 9,0, 1 M : 60 μ l

Eau distillée : complément à 600 μ l

La réaction est mise en route par addition de 25 μ l d'extrait dialysé de la souche de *S. cerevisiae* 1245/2b galactokinase-négative. On laisse la réaction se poursuivre jusqu'à valeur constante. Parallèlement, on effectue le même essai sur une cuvette contrôle contenant, à la place du mélange incubé (1), 100 μ l de ce même mélange ayant été inactivé par ébullition au temps 0 de l'incubation 1.

Dans ces conditions, la quantité de TPN réduite au cours du test correspondait à 0,023 μ mole (blanc déduit). Il y avait donc eu, dans le mélange d'incubation (1), 0,759 μ mole de De-Gal-1-P, formé, pendant la durée de l'incubation.

Lorsque le substrat est du galactose, on a observé la formation de 0,573 μ mole de galactose-1-phosphate, au cours d'une incubation de 60 minutes. Le temps d'incubation ayant été ici de 90 minutes on aurait dû s'attendre à trouver 0,860 μ mole de De-Galactose-1-phosphate, si l'enzyme phosphoryle les deux substrats à la même vitesse.

On voit donc que le 2-désoxygalactose semble avoir été phosphorylé par la galactokinase presque aussi effectivement que le galactose. Ceci correspond tout à fait aux résultats obtenus pour la phosphorylation du glucose par l'hexokinase (SOLS et CRANE, 1954). Dans ce dernier cas, bien que le K_m pour le désoxyglucose soit trois fois plus grand que le K_m pour le glucose, les vitesses maxima (à concentration saturante) sont les mêmes pour les deux substrats.

3) *Dosage de l'UDPG en excès.* — Au cours de la réaction précédente il s'est formé de l'UDP-DeGal. Afin d'en doser la quantité formée, ce qui constituera un contrôle de la réaction précédente (la quantité d'UDPDeGal devant être en relation stoechiométrique avec la quantité de DeGal-1-P présente au départ), il est nécessaire d'éliminer l'excès d'UDPG, second substrat de la Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase. Ceci peut être réalisé par la transformation irréversible de l'UDPG en acide UDP-glucuronique sous l'influence de l'UDPG déshydrogénase.

Le mélange d'incubation précédent (2) est porté à ébullition pendant trois

minutes, afin d'inactiver les enzymes, et centrifugé. Une partie aliquote du nouveau liquide surnageant obtenu est transférée dans une cuvette de BECKMAN. On y ajoute de l'UDPG déshydrogénase et du DPN en excès, et on laisse la réaction se poursuivre jusqu'à stabilisation complète. La différence de l'absorption à 340 m μ , entre le début et la fin de la réaction, permet de calculer que la cuvette contrôle contient encore 96 p. 100 de l'UDPG initial. L'extrait de *S. cerevisiae* utilisé ne contenait donc pas d'enzyme contaminante susceptible d'attaquer l'UDPG au cours du test. Ceci montre, de plus, que l'UDPG (et probablement aussi l'UDPGal) est chimiquement stable au cours de l'ébullition dans le mélange réactionnel (2).

Par contre, la cuvette ayant reçu le mélange actif ne contenait plus que 0,036 μ mole d'UDPG. Il y a donc un déficit d'UDPG correspondant à 0,036 μ mole. Une quantité équivalente devrait donc être retrouvée sous forme d'UDP-DeGal dans le test suivant.

4) *Epimérisation de l'UDPDeGal en UDPDeG.* — Sous l'influence de l'UDPGal-4-épimérase) : Dans les cuvettes provenant de l'incubation (3), l'UDPG ayant été quantitativement éliminé, il suffit d'ajouter un excès d'UDPGal-4-épimérase.

Cette réaction s'est montrée positive dans la cuvette expérimentale et nulle dans la cuvette de contrôle. Après stabilisation, il a pu être calculé que cette cuvette contenait 0,029 μ mole d'UDPDeGal. Compte tenu des dilutions, cette quantité correspond à 78 p. 100 du déficit en UDPG constaté dans l'étape précédente (3).

5) *Bilan.* — Le bilan du métabolisme du 2-désoxygalactose, tel qu'il a été mis en évidence par les réactions précédentes s'établit comme suit :

— 2-désoxygalactose phosphorylé	0,759 μ mole
— 2-désoxygalactose transformé en UDPDeGal	0,790 μ mole
— 2-désoxygalactose transformé en UDPDeG	0,594 μ mole

L'évolution spectrophotométrique des réactions qui viennent d'être décrites est représentée dans la figure 10.

6) *Discussion et conclusions des expériences in vitro.* — Ces expériences montrent que :

a) le 2-désoxygalactose est un excellent substrat de la galactokinase puisqu'il est phosphorylé presque aussi rapidement que le galactose ;

b) le désoxygalactose-1-phosphate qui résulte de l'action de la galactokinase peut être quantitativement transformé en UDP-désoxygalactose sous l'action de la Gal-1P/G-1-P uridyltransférase de levure. Ici, le substrat étant facteur limitant, il n'est pas possible de comparer les vitesses maxima, mais la vitesse de la réaction semble très comparable à celle que l'on observe lorsque l'enzyme est testée avec des quantités voisines de galactose-1-phosphate. On peut donc également dire que le désoxygalactose-1-phosphate est un excellent substrat de la Gal-1P/G-1P uridyltransférase ;

c) l'UDP-Désoxygalactose qui résulte de l'action des deux enzymes précédentes semble également être un substrat de l'UDPGal-4-épimérase. Toutefois, le dosage enzymatique n'a permis de retrouver que 78 p. 100 de la quantité prévue. Ce rendement un peu faible peut évidemment être dû à des pertes au cours des différents transferts. Il est possible, cependant, que ce résultat puisse être expliqué par un effet inhibiteur des produits de la réaction de l'une des deux enzymes impliquées dans

ce dernier test. Dans les conditions employées pour le dosage de l'UDPGal (ici UDPGDeGal), l'UDPG est constamment transformé en acide UDP-glucuronique (ici UDP-DeGlucuronique), lequel s'accumule au cours de la réaction. Une inhibition partielle de l'UDPGal-4-épimérase ne devrait pas empêcher que la transformation en acide UDPDeGlucuronique soit complète. Il est donc plus probable qu'une

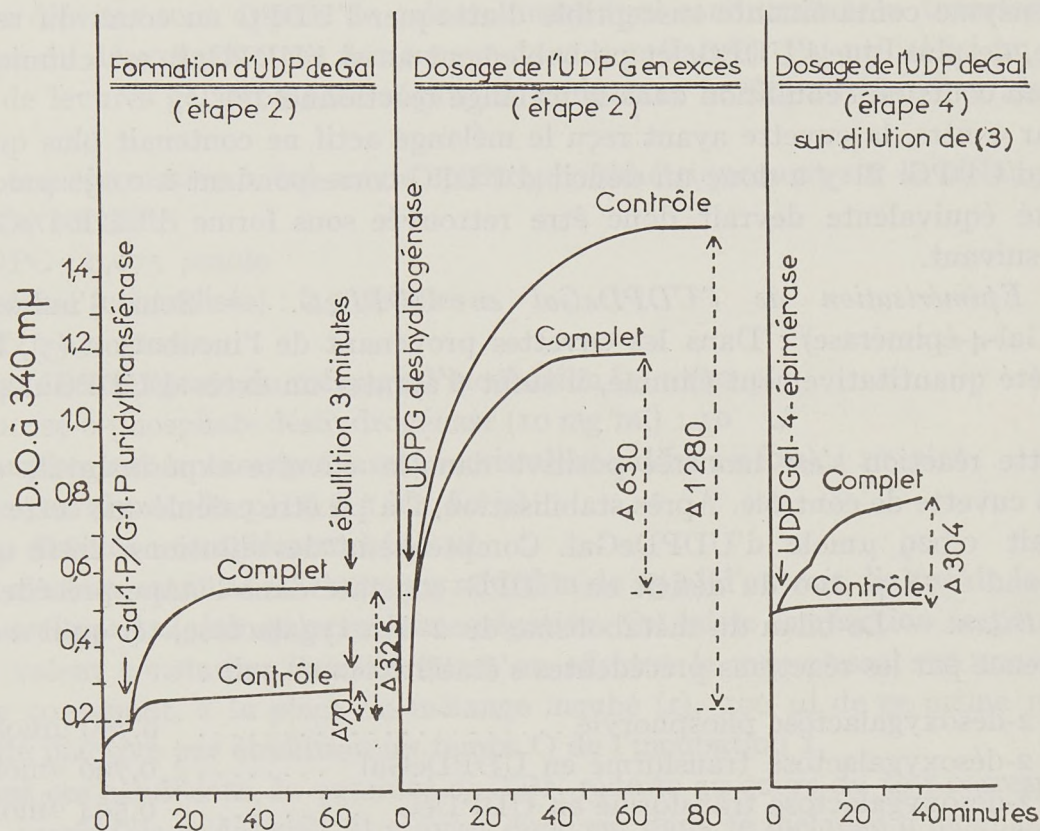


FIG. 10. — Dosage spectrophotométrique des composés formés à partir du 2-désoxy-D-galactose, sous l'action des enzymes du métabolisme du galactose. Se reporter au texte pour la composition des mélanges d'incubation.

éventuelle inhibition s'exerce sur l'UDPG déshydrogénase plutôt que sur l'UDPGal-4-épimérase.

Quoi qu'il en soit, on peut donc raisonnablement conclure que l'UDP-DeGal formé au cours de ces deux premières réactions est épimérisé (au moins à 80 p. 100) en UDP-désoxyglucose.

Inhibition, par le 2-désoxygalactose, du métabolisme in vitro du galactose :

Il ressort de ce qui précède que — le 2-désoxygalactose se comportant comme un substrat des trois enzymes du métabolisme du galactose — on doit s'attendre à ce qu'il se comporte, en présence du galactose, comme un inhibiteur.

Une expérience a été effectuée en ce sens, expérience dont les résultats sont résumés dans le tableau 4. On voit que la transformation du galactose en UDPGal (catalysée par la galactokinase et la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase) est très fortement inhibée (33,5 p. 100) par la présence d'une concentration équimoléculaire de désoxygalactose. Il a été vérifié, par dosage spécifique des 2-désoxysucres (voir Techniques) que, même dans ce cas, le désoxygalactose est effectivement incorporé

sous forme nucléotidique (dans l'éluat Norite). Il n'a toutefois pas été possible d'étudier en détail le caractère compétitif ou non-compétitif de cette inhibition.

TABLEAU 4

Effet du 2-désoxygalactose sur la formation d'UDPGal à partir de ^{14}C -Galactose

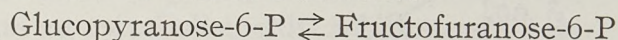
L'incubation a été faite à 37°, 60 minutes à pH 7,5 en présence d'un excès de galactokinase et de Gal-1P/G-1-P uridyltransférase.

Incubation	Galactose incorporé (10^{-3} μmoles)	Désoxygalactose incorporé (10^{-3} μmoles)
Galactose (1 μmole)	81,2	0
Galactose (1 μmole) + désoxygalactose (1 μmole)	54,0	9,5

Métabolisme in vivo :

Afin de vérifier si les constatations faites *in vitro* pouvaient s'appliquer à la cellule intacte, j'ai effectué quelques expériences ayant pour but de déterminer l'effet du 2-désoxygalactose sur la respiration et la fermentation des levures.

Pour cela, il a semblé intéressant de comparer les effets du 2-désoxy-galactose à ceux du 2-désoxyglucose. En effet, on sait que ce dernier est phosphorylé et qu'il s'accumule sous forme de désoxy-glucose-6-phosphate, qui se comporte, *in vitro*, comme un inhibiteur de la phospho-hexose-isomérase (Wick et coll., 1957), enzyme qui effectue la réaction suivante :



Si le désoxygalactose est capable, *in vivo* comme *in vitro*, d'être transformé en désoxyglucose-1-phosphate, on peut penser qu'il le sera également en désoxyglucose-6-phosphate, sous l'action de la phosphoglucomutase. Son effet inhibiteur devrait, dans ces conditions, s'exercer aussi bien sur le métabolisme du glucose que sur celui du galactose. Si, au contraire, le désoxygalactose n'est pas, *in vivo*, transformé en désoxyglucose-6-phosphate, on peut s'attendre à ce qu'il se comporte, avant tout, comme un inhibiteur du métabolisme du galactose et, seulement secondairement, de celui du glucose.

La figure 11 résume l'ensemble de ces expériences. Il peut en être retenu que le désoxygalactose exerce sur la respiration du glucose, aussi bien que sur sa fermentation, un effet inhibiteur égal ou même supérieur à celui qu'il exerce sur le métabolisme du galactose, et à celui qu'exerce le 2-désoxyglucose (à la même concentration) sur la respiration ou la fermentation du glucose.

Ces données expérimentales ne permettent pas de faire une analyse comparative détaillée des différentes cinétiques d'inhibition qui semblent être complexes.

Discussion et conclusions des expériences effectuées in vivo :

Comme cela a été montré au cours de l'introduction, le glucose-1-phosphate qui entre dans le métabolisme général, à partir du galactose, provient de l'action de la Gal-1P/G-1-P uridyltransférase. L'UDPG provient, au départ, d'un « pool » intracellulaire, maintenu par l'action de la G-1-P/PP uridyltransférase et, ensuite, de

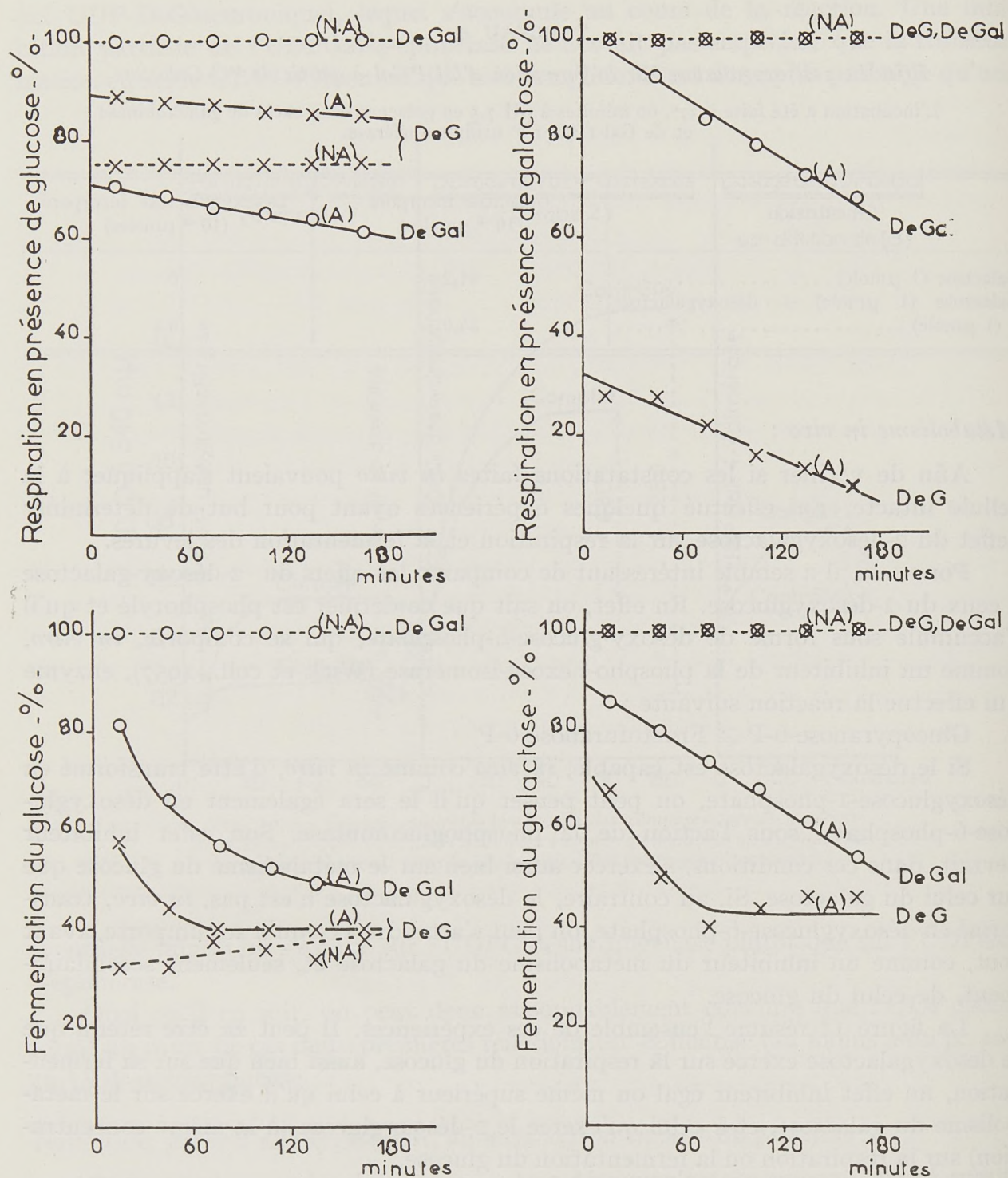


FIG. 11. — Effet du 2-désoxy-D-galactose et du 2-désoxy-D-glucose sur l'utilisation aérobie et anaérobie du glucose ou du galactose.

Souche CH-1.

(A) : Cellules adaptées au galactose.

(N. A.) : Cellules non adaptées au galactose.

Glucose, galactose, désoxyglucose et désoxygalactose ont été essayés à la concentration finale de 2 p. 100.

l'épimérisation $\text{UPDGal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$. C'est au cours de cette réaction que l'UDP-désoxyglucose se trouve formé.

A partir de ce moment le « pool » d'UDPG doit également contenir de l'UDPDeG. Du désoxyglucose-1-phosphate en résultera. Il a été dit précédemment que, si la phosphoglucomutase était inhibée de façon très importante, le métabolisme du galactose s'en trouverait perturbé beaucoup plus, ou en tous cas plus rapidement que celui du glucose (Voir schéma de la figure 12). Comme c'est plutôt l'inverse qui

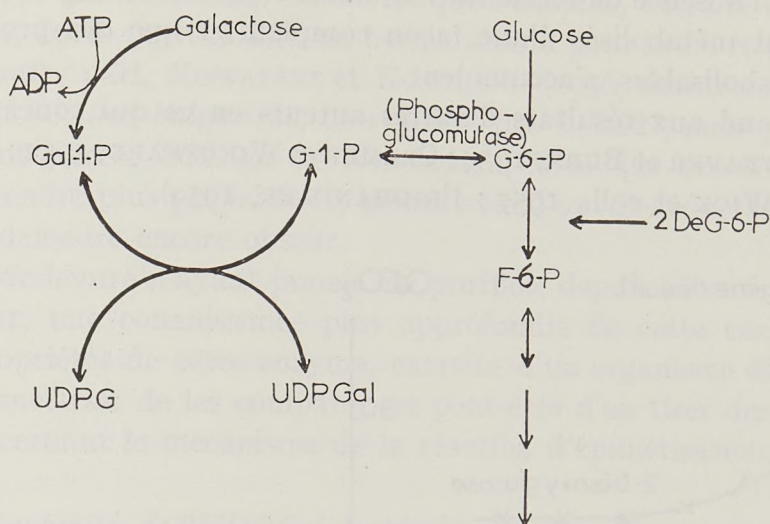


FIG. 12. — Relations entre le métabolisme du glucose et celui du galactose. Point d'action du 2-désoxy-D-glucose.

le produit, on peut présumer que cette enzyme n'apporte pas de perturbation importante au métabolisme du 2-désoxygalactose.

L'effet du 2-désoxygalactose se trouverait donc finalement être exactement le même que celui du 2-désoxyglucose, c'est-à-dire l'inhibition de la phosphohexose somérase. Certaines différences dans son action peuvent être imputées aux quatre étapes requises pour sa conversion en 2-désoxyglucose-6-phosphate, alors qu'une seule étape suffit lorsqu'on part du 2-désoxyglucose.

Remarques sur le mécanisme d'inhibition :

Toutes les réactions dont il a été question précédemment n'intéressent que des remaniements dans les positions 1 ou 6 du glucose ou du galactose. Bien que concevable, il ne semblait pas, a priori, absolument obligatoire qu'une réduction de l'hydroxyle en position 2 doive influencer ces réactions. Il en est tout autrement de la phosphohexose isomérase, puisqu'il s'agit ici d'une isomérisation Glucose-Fructose, dans laquelle la position 2 se trouve automatiquement impliquée.

La figure 13 montre que l'on observe une respiration faible (environ 15 au dessus du niveau de l'endogène pour le désoxyglucose, et 5 pour le désoxygalactose), mais aucune fermentation. Les produits utilisés pour les expériences *in vivo* (provenant des Laboratoires Aldrich) diffèrent des produits utilisés pour les expériences *in vitro* en ce que l'analyse chromatographique révèle la présence d'une petite quantité de glucose dans le 2-désoxyglucose et probablement de galactose dans le 2-désoxygalactose. Un essai effectué dans le but de savoir si la glucose-6-phosphate déshydrogénase était capable d'oxyder le 2-désoxygalactose-6-phosphate (par couplage avec

l'hexokinase), a montré une réaction limitée, compatible avec l'attaque du glucose présent comme impureté. Sur cette base, il est possible d'évaluer à 6 p. 100 la contamination du désoxyglucose par le glucose. L'impureté du désoxygalactose n'a pas été mesurée, mais la comparaison de l'importance des taches sur les chromatogrammes permet de l'estimer à environ 10 p. 100. Il est donc possible que les faibles QO_2 observés soient dûs à l'oxydation du glucose ou du galactose, présents à l'état d'impureté, dans ces produits commerciaux.

En tous cas, l'absence de fermentation montre que les désoxysucres ne peuvent être effectivement métabolisés d'une façon complète et que des produits intermédiaires, non métabolisables, s'accumulent.

Ceci correspond aux résultats d'autres auteurs en ce qui concerne le désoxyglucose (*cf.* LINEWEAVER et BURK, 1934; CRAMER et WOODWARD, 1952; WOODWARD et HUDSON, 1954; WICK et coll., 1957; FRIDHANDLER, 1959).

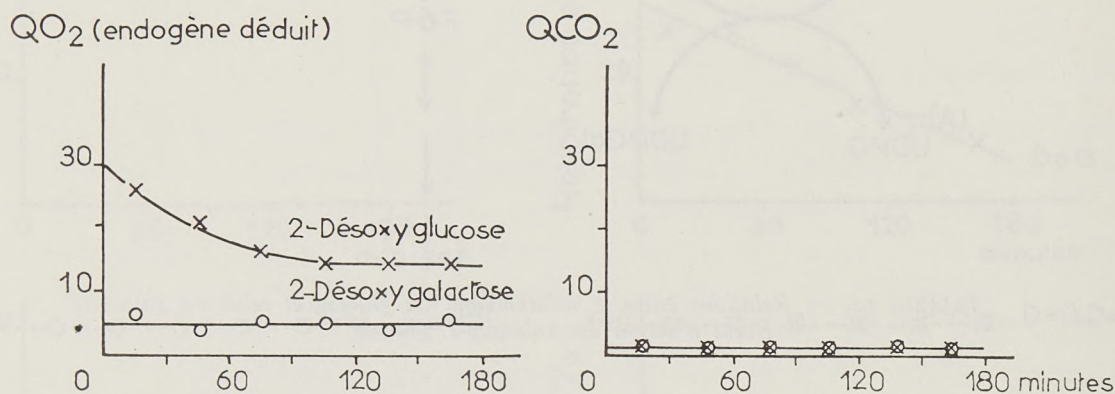


FIG. 13. — *Respiration et fermentation en présence de 2-désoxy-D-glucose et de 2-désoxy-D-galactose.*
Conditions identiques à celles de la figure 11.
Cellules adaptées à l'utilisation du galactose. Souche CH-1.

En résumé, on peut dire que le désoxygalactose est un substrat des enzymes du métabolisme du galactose, ce qui conduit vraisemblablement à sa transformation jusqu'au stade de l'UDP-désoxyglucose. L'étude de l'inhibition produite *in vivo* par le 2-désoxygalactose rend probable sa transformation ultérieure en 2-désoxyglucose-6-phosphate. Son action se trouve ainsi ramenée à celle du 2-désoxyglucose.

Le 2-désoxygalactose étant un substrat des enzymes du métabolisme du galactose et inhibant son utilisation *in vivo* comme *in vitro*, il est probable que des inhibitions de type compétitif avec le galactose pourraient être mises en évidence. Il serait nécessaire de préparer tout d'abord les produits intermédiaires : 2-désoxygalactose-1-phosphate, UDP-désoxygalactose et UDP-désoxyglucose.

Une telle étude permettrait d'obtenir des renseignements sur le mécanisme de certaines des réactions du métabolisme du galactose, et, en particulier, de celui de l'UDPGal-4-épimérase dont il sera question plus loin.

4.4. ÉTUDE DE L'UDPGAL-4-ÉPIMÉRISE.

Introduction :

L'enzyme effectuant l'épimérisation de l'UDPGalactose en UDPGlucose a été caractérisée pour la première fois par LELOIR (1951) chez *Saccharomyces fragilis*. Il nomma cette enzyme « Galactowaldénase », considérant comme le plus probable

un mécanisme reposant sur le principe d'une inversion de WALDEN. LELOIR (1951b) retenait cependant plusieurs autres mécanismes : déshydratation-réhydratation, déshydrogénation-réhydrogénation, cyclisation sous forme de L-inositol, selon l'ingénieux schéma suggéré par FISHER (1944).

Aucun des résultats expérimentaux ne permettant à ce moment d'opter pour tel ou tel de ces mécanismes, KALCKAR et MAXWELL (1956) proposèrent une dénomination ne préjugant pas du mécanisme de la réaction : UDPGal-4-épimérase.

C'est en 1956 que MAXWELL découvrit que l'enzyme, extraite du foie de mammifère, présente, après purification, un besoin absolu pour le DPN (le DPNH étant inhibiteur). D'autre part, KOWALSKI et KOSHLAND (1956) montrèrent que l'enzyme extraite de *Lactobacillus bulgaricus*, ne requiert pas le DPN, mais perd son activité après traitement par la DPNase de *Neurospora*. Bien que ces deux observations contribuent à rendre plus probable un mécanisme d'oxydo-réduction, le mécanisme de la réaction demeure encore obscur.

L'enzyme de levure n'ayant jamais été purifiée, depuis sa mise en évidence par LELOIR en 1951, une connaissance plus approfondie de cette enzyme s'imposait. L'étude des propriétés de cette enzyme, extraite d'un organisme différent des deux précédents, permettrait de les comparer, et peut-être d'en tirer des renseignements plus précis concernant le mécanisme de la réaction d'épimérisation.

Purification et propriétés de l'UDPGal-4-épimérase de levure :

Une première méthode de préparation a permis d'obtenir l'enzyme suffisamment purifiée (environ 80 fois). Il a été ainsi possible d'en déterminer les propriétés essentielles ; en particulier, l'enzyme possède une fluorescence caractéristique, ne montre pas d'exigence pour le DPN et n'est pas inhibée par le DPNH. L'élimination du composé responsable de la fluorescence de l'enzyme, par traitement par PCMB, DPNase, ou simplement vieillissement, a conduit à sa transformation en une enzyme semblable à l'enzyme de foie, c'est-à-dire non fluorescente, exigeant le DPN et inhibée par le DPNH. De même que l'enzyme de foie, l'enzyme de levure traitée n'incorpore pas le tritium à partir d'eau tritiée ou de DPNH tritié (MAXWELL, de ROBICHON-SZULMAJSTER et KALCKAR, 1958).

Une purification plus poussée (environ 150 fois) a permis de confirmer l'ensemble de ces propriétés, de déterminer par trois méthodes indépendantes que le composé responsable de la fluorescence de l'enzyme est le DPN et de mettre en évidence la corrélation étroite existant entre activité enzymatique, fluorescence et contenu en DPN (MAXWELL, et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960).

Je décrirai ici une préparation type, obtenue selon la seconde méthode, en faisant ressortir les différences principales avec la première méthode. Toutefois, les expériences concernant la détermination des propriétés de l'enzyme seront empruntées au matériel obtenu par l'une ou l'autre méthode, selon le cas.

A) Purification de l'enzyme :

1) *Obtention des cellules.* — 12 erlenmeyers de 6.l contenant 1500 ml de milieu 3S-galactose ont étéensemencés avec 100 ml d'une préculture de 24 heures de *S. fragilis*, effectuée dans le même milieu. Les erlens étaient fortement agités, à 28°, pen-

dant 24 heures. Les cellules, récoltées par centrifugation dans une centrifugeuse Sharpless, ont été lavées (dans la Sharpless), par passage d'un volume d'eau distillée égal au volume de la culture.

2) *Préparation des extraits.* — Le culot cellulaire (310 g poids humide) a été suspendu dans 1 litre de tampon glycolle, 0,1 M, pH 6,5, et broyé, par portions de 9 ml. dans un appareil de NOSSAL, selon les conditions habituelles (voir 3.7). Après élimination des billes de verre et centrifugation de l'extrait à grande vitesse (Lourdes, modèle SL), le volume du liquide surnageant était de 590 ml, et contenait 3,2 g de protéines.

3) *Élimination des acides nucléiques.* — Alors que dans la première méthode de préparation les acides nucléiques avaient été éliminés par précipitation à l'aide de Cl_2Mn (0,05 M, concentration finale), nous avons utilisé ici un procédé suggéré par P. BERG et W. E. RAZZEL (communication personnelle), consistant en une digestion autolytique des acides nucléiques : l'extrait a été additionné de 60 ml de tampon $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$, 1 M pH 7,0, et le mélange incubé à 37° pendant deux heures. L'examen des rapports d'extinction 260 m μ /280 m μ a montré que ce procédé conduit, dans notre cas, à l'élimination quasi-complète des acides nucléiques. De plus, aucune perte d'activité n'a lieu pendant le traitement.

A ce stade la préparation a été conservée congelée pour la nuit. Toutes les opérations ultérieures ont été effectuées entre 0 et +4°.

4) *Précipitation par le sulfate d'ammonium de la fraction « 0-50 p. cent saturation »* (I). — La solution a été amenée à 50 p. 100 de saturation par addition lente de 175 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ solide. Le précipité obtenu a été centrifugé et redissous dans 15 ml d'eau distillée.

5) *Précipitation par le sulfate d'ammonium de la fraction « 35-50 p. cent saturation »* (II). — La concentration en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ dans le précipité redissous était 9 p. 100 saturation (voir 3.15). La solution a été additionnée de 13,9 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, le précipité centrifugé et éliminé. Au nouveau liquide surnageant, 8,7 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ont alors été ajoutés. Toutes ces additions sont effectuées très lentement, par petites portions. Ce dernier précipité a été centrifugé et redissous dans 15 ml d'eau distillée.

6) *Dialyse.* — Préalablement au passage sur colonne de cellulose il est nécessaire de réduire au maximum la concentration en sels de la solution protéique. Au cours des précédentes préparations, la dialyse faite contre l'eau distillée, provoquait une perte d'activité variant entre 30 et 50 p. 100. Étant donné certaines des propriétés de l'enzyme (sensibilité au PCMB, protection par la cystéine), nous avons effectué la dialyse contre de l'eau distillée additionnée de mercaptoéthanol (0,25 ml par litre d'eau), pendant 2 h. 30. Dans ces conditions, aucune perte d'activité n'a eu lieu au cours de la dialyse.

La solution, après dialyse, contenait 225 mg de protéines (dans 15 ml).

7) *Chromatographie sur colonne de cellulose DEAE.* — La colonne employée avait 2,5 cm de diamètre et contenait 5 g de cellulose-DEAE, préalablement lavée par l'eau distillée (sur colonne), jusqu'à ce que le liquide d'élution présente une absorption nulle dans la région 260-280 m μ .

Dans la première méthode de purification, nous avons effectué l'élution à l'aide d'un gradient de ClNa allant de 0,1 M à 1 M. Une importante amélioration a été obtenue en employant, dans la deuxième méthode, un gradient mixte : ClNa -pH. A cet effet, le récipient mélangeur recevait 500 ml d'une solution de tampon glycol-

glycine, pH 6,0, 0,05 M, rendue 0,5 M en NaCl ; le récipient réservoir recevait alors 500 ml de tampon glycocole, pH 9,0, 0,05 M, rendu 0,6 M en NaCl (les deux tampons ont été ajustés au pH désiré par addition de NaOH).

Avant d'effectuer le dépôt de la solution protéique sur la colonne, une petite quantité d'une solution identique à celle du récipient mélangeur est passée au travers de la colonne, aux fins d'équilibration. La solution protéique est alors déposée à la surface de la cellulose ; on attend que son absorption soit complète. La colonne est ensuite connectée avec le récipient mélangeur et ce dernier mis en relation avec le récipient réservoir. La vitesse d'écoulement était réglée aux environs de 1,5 ml par minute. Des fractions de 10 ml ont été collectées.

Les fractions ont été examinées individuellement pour leur fluorescence (voir plus loin, résultats). Les fractions contenant le pic possédant la fluorescence caractéristique de l'épimérase ⁽¹⁾ (tubes 35 à 50) ont été réunies.

8) *Lyophilisation*. — Les fractions réunies, représentant un volume de 170 ml, ont été concentrées par lyophilisation jusqu'à un volume de 45 ml.

9) *Précipitation par le sulfate d'ammonium de la fraction « 0-75 p. 100 saturation » (III)*. — 140 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium ont été ajoutés à la solution lyophilisée précédente. Le précipité résultant a été centrifugé et redissous dans 6 ml de tampon glycyl-glycine, 0,25 M, pH 7,5.

Cette solution contenait toute l'activité présente dans l'extrait brut et ne contenait plus que 21 mg de protéines.

Le tableau 5 permet de suivre la purification au cours des principales étapes de la préparation décrite ci-dessus. On voit qu'elle aboutit à une purification finale de 150 fois, tout en permettant une récupération totale de l'activité.

A ce stade de purification l'enzyme de levure a une activité spécifique cinq fois plus élevée que l'enzyme de foie.

TABLEAU 5

Purification de l'UDPGal-4-épimérase de Saccharomyces fragilis (voir texte)

Fraction	Unités	Activité spécifique (Unités/mg protéines $\times 10^{-3}$)
Extrait brut.....	22×10^5	0,5
Sulfate d'ammonium I.....	16×10^5 ⁽¹⁾	1,8
Sulfate d'ammonium II.....	17×10^5 ⁽¹⁾	7,1
Eluat DEAE-cellulose.....	23×10^5	50
Sulfate d'ammonium III.....	22×10^5	75

⁽¹⁾ L'activité de l'enzyme est inhibée par le sulfate d'ammonium.

B) Propriétés de l'enzyme

1) *Conservation*. — L'enzyme purifiée peut être conservée à -20° , soit en solution stable dans le tampon glycyl-glycine pH 7,5, soit à l'état de poudre lyophilisée, sans perte d'activité pendant au moins deux mois.

⁽¹⁾ Étant donné la corrélation étroite déjà observée au cours des précédentes préparations entre activité et fluorescence, il n'était pas nécessaire de mesurer individuellement l'activité enzymatique des fractions.

2) *pH optimum*. — De même que l'enzyme de foie, l'épimérase de levure a un très large optimum de pH situé entre 8,0 et 9,5.

3) *Equilibre*. — A l'équilibre, le rapport UDPG/UDPGal est de 3/1, ce qui est en accord avec les données de LÉLOIR (1951) sur l'enzyme de levure, et de MAXWELL (1956) sur l'enzyme de foie.

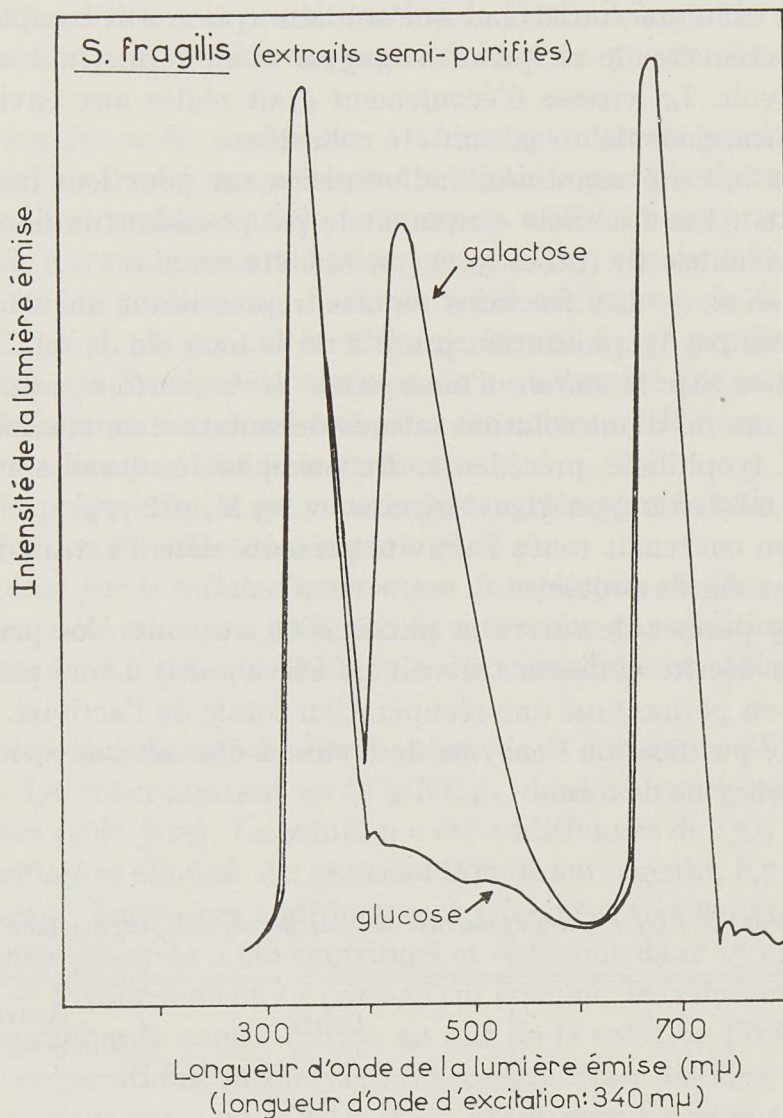


FIG. 14. — Spectre de fluorescence des extraits semi-purifiés provenant de cultures de *Saccharomyces fragilis* adaptée (galactose) et non-adaptée (glucose). Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

4) *Fluorescence*. — Des observations préliminaires avaient montré que l'enzyme de levure ne requiert pas le DPN (même à un stade de semi-purification auquel l'enzyme de foie est déjà fortement stimulée par le DPN) et n'est pas inhibée par le DPNH. Il est d'autre part connu que certaines déshydrogénases, soit spontanément, soit en présence de DPNH, montrent une fluorescence dont la longueur d'onde (activation et émission) est voisine de celle du DPNH libre (*cf.* BOYER et THEORELL, 1956 ; RACKER et KRIMSKY, 1958 ; DUYSSENS et KRONENBERG, 1957 ; WINER et coll., 1959). Il a donc semblé intéressant de rechercher si l'enzyme extraite de la levure possédait une fluorescence.

Dans ce but, des cultures de *S. fragilis* ont été effectuées parallèlement sur milieu 3S contenant soit du glucose, soit du galactose, comme source carbonée. Comme il sera montré dans la troisième partie de l'exposé, l'UDPGal-4-épimérase est formée adaptativement en présence de galactose et est absente des cultures effectuées en présence de glucose.

Il a été surprenant de constater qu'une différence très notable existe déjà entre la fluorescence des deux extraits bruts. Dès le premier fractionnement par le sulfate d'ammonium, la fraction contenant l'activité épimérasique (provenant de la culture sur galactose) garde une fluorescence importante, tandis que la fraction correspondante, provenant de la culture sur glucose, ne présente plus qu'une fluorescence très faible (voir figure 14, pic à 450 m μ).

Après purification sur colonne de cellulose, on constate qu'à l'endroit où apparaît le pic qui contient l'activité épimérasique (pic N° 8, figure 17) les fractions « glucose » continuent d'être dépourvues de fluorescence. Il existe, au contraire, dans les fractions « galactose », une corrélation étroite entre activité et fluorescence ⁽¹⁾ (voir plus loin). De plus, comme le montre le tableau 6, lorsque dans certaines conditions la conservation prolongée de l'enzyme conduit à une diminution de la fluorescence, on constate une perte parallèle de l'activité.

Le spectre de fluorescence de l'UDPGal-4-épimérase purifiée à partir de la levure rappelle celui du DPNH, tant en ce qui concerne la longueur d'onde maximum de la fluorescence (450 m μ) que la longueur d'onde produisant le maximum d'excitation (350 m μ). Cependant, le DPNH étant inhibiteur de la réaction, nous avons formulé l'hypothèse que le corps responsable de la fluorescence de l'enzyme pouvait être le DPN (non fluorescent à l'état libre), lié à l'enzyme de telle sorte que le complexe DPN-enzyme acquiert la fluorescence caractéristique du DPNH.

TABLEAU 6

Effet du vieillissement sur la fluorescence et l'activité de l'UDPGal-4-épimérase de S. fragilis

Les échantillons ont été conservés congelés pendant 5 semaines, dégelés et recongelés à plusieurs reprises.

N° des fractions	Fluorescence % de l'original	Activité % de l'original
32	20	20
33	30	32
34	33	29

(5) *Effet du PCMB.* — VELICK (1953), et RACKER et KRIMSKY (1952) ont montré que le DPN lié à la triosephosphate déshydrogénase du muscle peut en être dissocié par action du *p*-chloromercuribenzoate, avec perte simultanée de la bande d'absorption caractéristique du complexe original DPN-enzyme.

L'action du PCMB (10⁻⁴M) sur l'épimérase de levure a pour effet immédiat la

⁽¹⁾ L'UDPGal-4-épimérase n'est pas la seule protéine fluorescente présente dans les extraits. D'autres fractions dont l'identité enzymatique n'a pas été recherchée (mais qui ne présentent pas d'activité épimérasique) apparaissent au début de l'élution.

diminution et, après environ 4 minutes, la disparition complète de la fluorescence de l'enzyme. La figure 15 en donne un exemple.

6) *Réactivation de l'enzyme après traitement par le PCMB. Propriétés de la nouvelle enzyme.* — L'enzyme traitée est reprécipitée par le sulfate d'ammonium et redissoute dans l'eau. Comme le montre le tableau 7, seule une activité très faible peut être décelée en absence de DPN. Cependant, de même que l'enzyme de foie, l'enzyme de levure, après traitement par le PCMB (« enzyme traitée ») présente une exigence absolue envers ce coenzyme. D'autre part, l'« enzyme traitée » ne présente plus aucune fluorescence (seule, en combinaison avec le DPN ou avec substrat + DPN) ce qui l'apparente également à l'enzyme de foie, laquelle n'est jamais fluorescente.

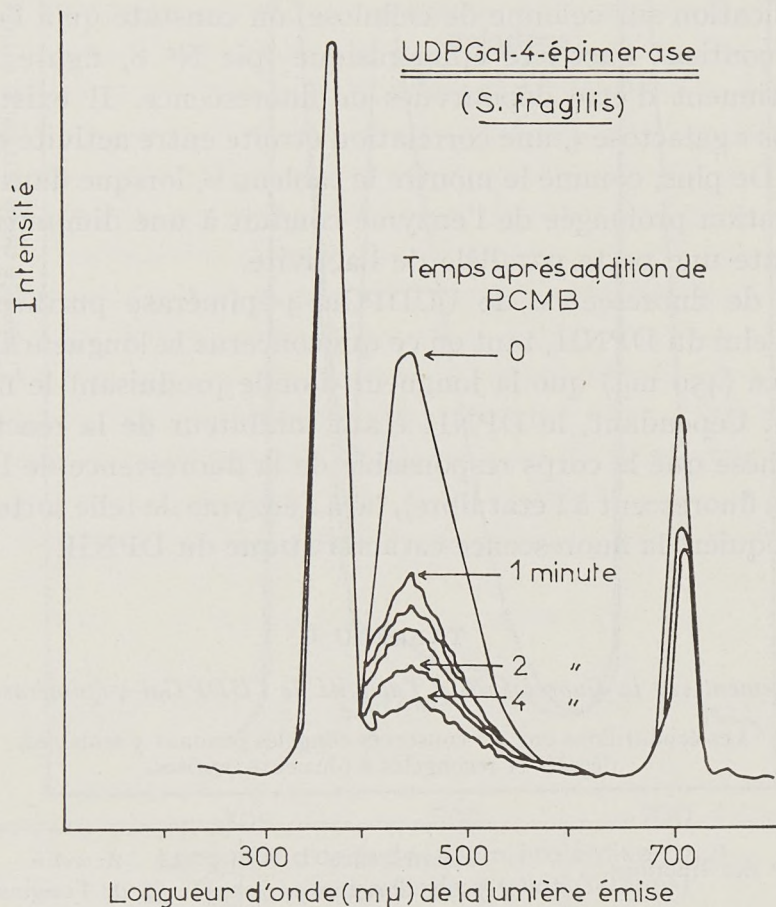


FIG. 15. — UDPGal-4-épipimérase de *Saccharomyces fragilis* : évolution du spectre de fluorescence au cours du traitement par le PCMB ($10^{-4}M$).

D'autres propriétés la rapprochent de cette enzyme : comme le montre le tableau 7, la réactivation de l'« enzyme-traitée » a lieu de façon spécifique par le DPN (DPNH, TPN, TPNH sont inactifs). Le DPNH, en présence de DPN est légèrement inhibiteur. Le K_m pour le DPN (lorsque substrat et enzyme sont en excès) est de l'ordre de $10^{-5}M$ dans le cas de l'enzyme de levure traitée puis réactivée, alors qu'il est de l'ordre de $10^{-7}M$ pour l'enzyme de foie. La cystéine, en présence de DPN, stimule (environ 30 p. 100) l'activité de l'« enzyme-traitée », mais seule, reste inactive. Or, la cystéine est sans effet sur l'enzyme de levure non traitée, alors qu'elle stimule l'activité de l'enzyme de foie. Il semble donc qu'un état réduit de l'enzyme favorise son activité en présence de DPN exogène.

Il est également intéressant de remarquer que la réactivation par le DPN et la cystéine ne permet de retrouver que 20 p. 100 environ de l'activité originale de l'enzyme non traitée (voir tableau 7). Ceci peut être rapproché du fait, déjà signalé (voir préparation de l'enzyme), que l'enzyme de levure non-traitée présente, au même stade de purification, une activité cinq fois supérieure à celle de l'enzyme de foie. Il est possible que le complexe temporaire du type DPN-épimérase de foie, peut-être identique au complexe DPN-« PCMB épimérase de levure », soit cinq fois moins efficace que le complexe stable, fluorescent, DPN-épimérase de levure non-traitée.

TABLEAU 7

Réactivation de l'UDPGal-4-épimérase de *S. fragilis* ; spécificité du DPN

2 ml de l'une des fractions les plus actives après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose ont été traités pendant 30 minutes par addition de 20 μ l de PCMB 10^{-3} M. L'enzyme a été ensuite reprécipitée par addition de 5 mg d'albumine et 0,8 mg de $\text{SO}_7(\text{NH}_4)_2$ et redissoute dans 2 ml d'eau. Le mélange d'incubation contenait : 0,05 μ mole d'UDPGal, 20 μ moles de cystéine, 20 μ l d'« enzyme traitée » et des nucléotides selon les indications portées dans le tableau. Le volume total était 0,5 ml et rendu 0,1 M en tampon glycocholate pH 8,8. L'incubation, à température ordinaire, 30 minutes, était arrêtée par addition de 1 ml de chloroforme. Le dosage de la quantité d'UDPG formé était effectué spectrophotométriquement par addition de DPN et d'UDPG déshydrogénase.

Nucléotide ajouté	UDPG formé (μ moles)
Enzyme non-traitée	76
Enzyme traitée ; sans addition	< 0,5
DPN 6×10^{-5} M	16
DPN 6×10^{-6} M	3,9
DPN 6×10^{-7} M	1,0
DPNH 1×10^{-4} M	< 0,5
TPN 2×10^{-4} M	< 0,5
TPNH 2×10^{-4} M	< 0,5
DPN 6×10^{-5} M + DPNH 1×10^{-5} M ...	13

7) *Effet des DPNases*. — Deux enzymes d'origines différentes attaquant spécifiquement le DPN ont été essayées : l'une est extraite d'un *Clostridium*, l'autre est la DPNase classique de *Neurospora*. Après incubation avec chacune de ces deux enzymes, puis fractionnement, l'activité de l'épimérase de levure est complètement abolie.

Tous les résultats et les comparaisons qui précèdent sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle le DPN serait le composé lié à l'enzyme de levure, composé responsable de sa fluorescence, et indispensable à son activité. Il était cependant nécessaire d'en apporter des preuves directes. Ceci a été réalisé par trois méthodes différentes.

8) *Identification du DPN lié à l'enzyme de levure*. — Les dosages ont été effectués, soit individuellement, sur les fractions provenant de la colonne de cellulose, soit sur un mélange de plusieurs fractions. Dans ce dernier cas, le mélange était concentré par lyophilisation puis ajusté à pH 3 par addition de HCl, 1 M. Pour chaque détermination deux échantillons semblables étaient prélevés. L'un d'eux était incubé pendant deux heures à 37° avec un excès de DPNase de *Neurospora* et était ensuite utilisé comme contrôle.

a) *Détermination chimique.* — La méthode de CIOTTI et KAPLAN (1957) utilisant la méthyl-éthyl-cétone a été employée. Cette méthode, appliquée à chaque fraction provenant de la colonne de cellulose a donné les résultats représentés dans

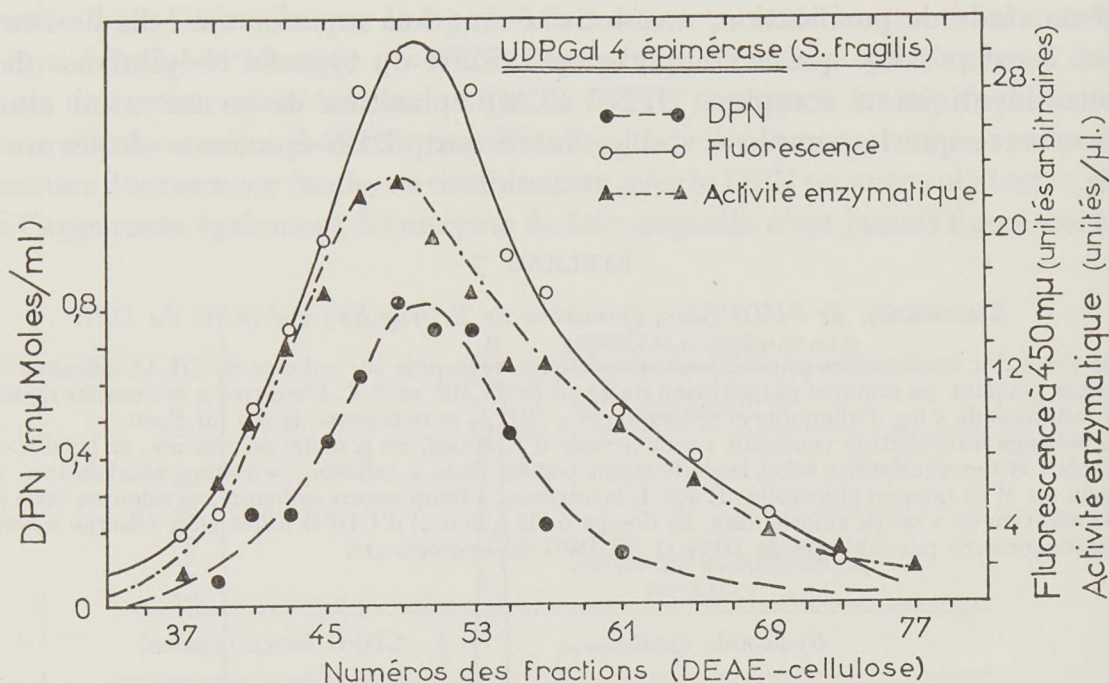


FIG. 16. — Chromatographie de l'UDPGal-4-épimérase de *Saccharomyces fragilis* sur colonne de DEAE-cellulose. Activité enzymatique, fluorescence et contenu en DPN des fractions isolées.

la figure 16. On voit qu'une excellente corrélation est ainsi mise en évidence entre l'activité, la fluorescence et la quantité de DPN qui peut être extraite de l'enzyme et dosée spécifiquement par cette méthode. La fraction la plus active contenait 0,3 μ mole de DPN pour 100 mg d'enzyme.

b) *Détermination enzymatique.* — Ces déterminations ont été effectuées sur des échantillons moyens composés de plusieurs tubes prélevés, soit au centre du pic de l'épimérase, soit de part et d'autre de ce pic. Après lyophilisation et ajustement du pH, 10 mg de Darko KB ont été ajoutés ; chaque mélange, agité mécaniquement pendant 45 minutes, a été centrifugé et lavé une fois par HCl 0,01 N. Les nucléotides adsorbés ont été élués par 5 ml d'éthanol à 50 p. 100 contenant 1 ml de NH_4OH concentré par litre. L'éluat a ensuite été concentré par évaporation et l'alcool ainsi éliminé du résidu.

Dosage par couplage avec le système enzymatique pyruvate-lacticodéshydrogénase + alcooldéshydrogénase et dosage du pyruvate en excès, selon une modification de la méthode utilisée par BURMA et HORECKER (1958) : les résultats de ce dosage sont résumés dans le tableau 8. Alors que le dosage par la méthyl-éthyl-cétone donne 0,012 μmole de DPN dans l'échantillon moyen considéré ici (tubes 46-53), les données du tableau 8 ne donnent qu'une valeur minimum de 0,006 μmole, soit 50 p. 100 de la valeur précédente.

Dosage par activation de l'UDPGal-4-épimérase de foie : On sait que la vitesse de la réaction est proportionnelle (dans une certaine zone) à la concentration en DPN (MAXWELL, 1957). Les stimulations observées pour les échantillons 2 et 3, traités

TABLEAU 8

Identification du DPN par dosage du pyruvate disparu

Le mélange d'incubation contenait : 20 μ l d'éthanol à 95 p. 100, 0,25 μ mole de pyruvate de sodium, un large excès de lactico- et d'alcool-déshydrogénase, et, soit une quantité connue de DPN, soit une partie aliquote de la solution à analyser. Le volume final de 0,2 ml était rendu 0,01 M en tampon phosphate pH 7,4, incubé pendant 20 minutes, à température ordinaire, puis inactivé par ébullition pendant 3 minutes. Le pyruvate restant après incubation était déterminé spectrophotométriquement par addition de DPNH et de lactico-déshydrogénase.

Additions	Pyruvate réduit (μ moles)
Sans addition	5
DPN 0,18 μ moles	22
DPN 0,35 μ moles	44
DPN 0,70 μ moles	72
Eluat Darko, (46-53) 25 μ l	92
Eluat Darko, (46-53) 50 μ l	160

comme ci-dessus, correspondant aux tubes centraux du pic de l'épimérase, conduisent à une valeur approximative de 0,2 μ mole de DPN pour 100 mg de protéine. Les échantillons 1 et 4, également traités, provenant de fractions n'ayant pas d'activité épimérasique, ne produisent aucune stimulation (voir tableau 9).

Ces trois valeurs, obtenues par des méthodes très différentes, et bien que la seconde soit un peu faible, sont en bon accord et montrent de façon certaine que le composé lié à l'enzyme est bien du DPN.

TABLEAU 9

Identification du DPN par mesure de l'activation de l'UDPGal-4-épimérase de foie

Le mélange d'incubation contenait : 0,06 μ mole d'UDPGalactose, 10 μ g d'UDPGal-4-épimérase purifiée à partir de foie de veau et, soit une quantité connue de DPN, soit une partie aliquote de la solution à analyser, dans un volume final de 0,5 ml et tampon glycocolle 0,1 M, pH 8,8. L'incubation, à température ordinaire, 10 minutes, était arrêtée par ébullition 1 minute. La quantité d'UDPG formée pendant l'incubation était déterminée spectrophotométriquement par addition de DPN et d'UDPG déshydrogénase.

Additions	UDPG formé (μ moles)
Sans addition	< 0,5
DPN 0,075 μ moles	3,1
DPN 0,15 μ moles	5,4
DPN 0,37 μ moles	9,0
DPN 0,75 μ moles	11,0
Eluat Darko n° 1 (en dehors du pic).....	< 0,5
Eluat Darko n° 2 (à l'intérieur du pic).....	6,2
Eluat Darko n° 3 (à l'intérieur du pic).....	6,4
Eluat Darko n° 4 (en dehors du pic).....	< 0,5

9) *Pureté de l'enzyme.* — L'enzyme purifiée ne contient pas d'autres enzymes du métabolisme du galactose, et aucune des enzymes utilisées dans les tests enzymatiques utilisés couramment au cours de ce travail (UDPG-déshydrogénase, G-1-P/PP uridyltransférase, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate déshydrogénase).

Si l'on compare les diagrammes obtenus dans deux préparations parallèles, l'une effectuée à partir de cellules cultivées sur glucose, et l'autre à partir de levures cultivées sur galactose, on constate, grâce à la grande reproductibilité des diagrammes d'élution, que le pic contenant l'épimérase (pic N° 8) est représenté par un pic protéique correspondant, dans la préparation où l'enzyme n'est pas présente (voir figure 17).

La figure 18 reproduit la variation de l'activité spécifique en fonction de l'éluat. Cette figure contient, en surimpression, le pic protéique, tel qu'il peut être redessiné à partir du diagramme d'élution. On voit que ce pic s'identifie avec le « cœur » de l'activité, les queues » et les « têtes » correspondant visiblement à des phénomènes d'entraînement par les pics protéiques adjacents.

L'examen du contenu en DPN des fractions les plus pures de l'enzyme (voir précédemment) conduit au chiffre approximatif de 0,3 μ mole de DPN pour 100 mg de protéines. Quel que soit le rôle que l'on attribue au DPN il doit y avoir au moins 1 mole de DPN par mole d'enzyme. On peut donc faire le calcul représenté dans le tableau 10.

TABLEAU 10

Relation entre le contenu en DPN et le poids moléculaire de l'enzyme

Pureté de l'enzyme	Moles DPN/Mole Enzyme		
	1 Mole	2 Moles	4 Moles
	Poids moléculaire		
100 %	500 000	1 000 000	2 000 000
50 %	250 000	500 000	1 000 000
25 %	125 000	250 000	500 000
12 %	62 500	125 000	250 000
6 %	31 250	62 500	125 000

Si l'on postule un poids moléculaire de 125 000, la pureté de la préparation se situerait entre 6 et 25 p. 100 selon que l'on admet 1, 2 ou 4 moles de DPN par mole d'enzyme.

10) *Expériences utilisant le tritium.* — Plusieurs tentatives, effectuées dans des conditions semblables à celles déjà signalées (KALCKAR et MAXWELL, 1956; KOWALSKI et KOSHLAND, 1956; MAXWELL, 1957), ont été faites à l'aide de différentes préparations de l'UDPGal-4-épimérase de levure. Comme dans le cas de l'enzyme de foie, ou de celui de *L. bulgaricus*, les résultats ont été entièrement négatifs, aussi bien en effectuant la réaction dans de l'eau tritiée qu'en présence de DPN tritié et de DPNH contenant deux atomes de tritium en position *para*. Par exemple, dans une expérience utilisant 0,1 ml d'eau tritiée et une radioactivité de 2×10^{10} cpm, 140 cpm ont été retrouvés dans les 0,5 μ moles de nucléotides introduites, alors que le contrôle (mélange réactionnel porté à 100° au temps 0 de l'expérience) contenait 120 cpm. De même, à partir de 0,54 μ mole de DPNH contenant 9500 cpm, les 4 échantillons (2 contrôles, 2 incubations) renfermaient, en fin d'expérience, entre 10 et 20 cpm.

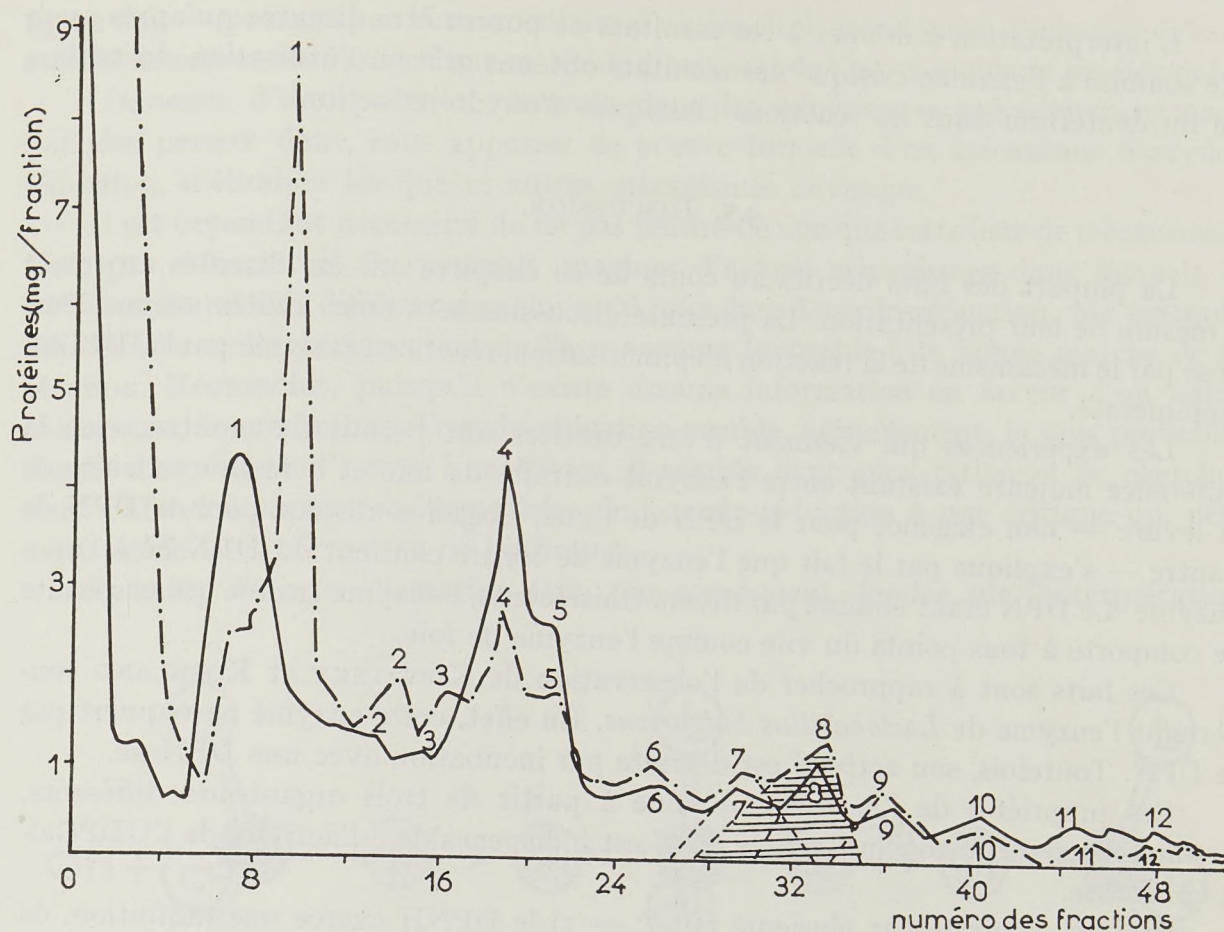


FIG. 17. — Chromatographie d'extraits semi-purifiés de *Saccharomyces fragilis*, adaptée et non-adaptée, sur colonne de DEAE-cellulose.

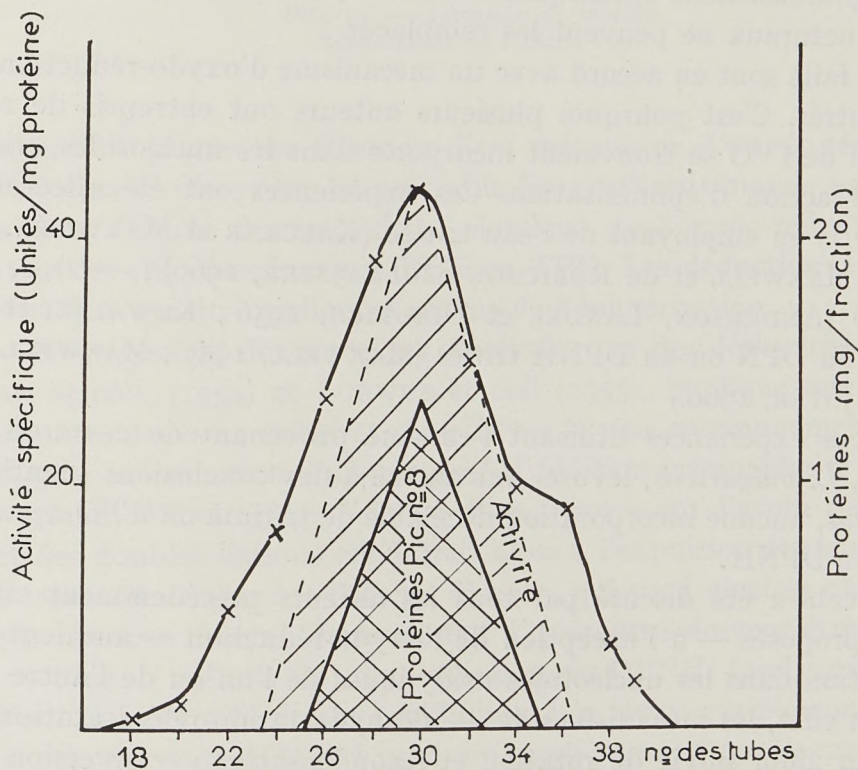


FIG. 18. — Coïncidence du pic protéique N° 8 et du pic contenant l'UDPGal-4-épimérase.

L'interprétation à donner à ces résultats ne pourra être discutée qu'après avoir été soumise à l'examen critique des résultats obtenus grâce à l'utilisation du tritium ou du deuterium dans les réactions classiques d'oxydo-réduction.

4.5. DISCUSSION.

La plupart des faits décrits au cours de ce chapitre ont été discutés au fur et à mesure de leur présentation. La présente discussion sera donc limitée au problème posé par le mécanisme de la réaction d'épimérisation, réaction catalysée par l'UDPGal-4-épimérase.

Les expériences qui viennent d'être décrites ont permis de montrer que la différence majeure existant entre l'enzyme extraite de foie et l'enzyme extraite de la levure — non exigence pour le DPN de l'une, exigence absolue pour le DPN de l'autre — s'explique par le fait que l'enzyme de levure contient du DPN lié à l'apo-enzyme. Le DPN étant éliminé par divers traitements, l'enzyme traitée qui en résulte se comporte à tous points de vue comme l'enzyme de foie.

Ces faits sont à rapprocher de l'observation de KOWALSKY et KOSHLAND concernant l'enzyme de *Lactobacillus bulgaricus*. En effet, cette enzyme ne requiert pas le DPN. Toutefois, son activité est détruite par incubation avec une DPNase.

Ces propriétés de l'enzyme, obtenue à partir de trois organismes différents, permettent donc de conclure que le DPN est indispensable à l'activité de l'UDPGal-4-épimérase.

Ceci est confirmé par plusieurs faits : — 1) le DPNH exerce une inhibition, de caractère compétitif, de la stimulation produite par le DPN sur l'activité de l'enzyme de foie ; — 2) le DPNH inhibe également l'activité de l'enzyme-traitée de levure, en présence de DPN ; — 3) les effets du DPN (stimulateur) ou du DPNH (inhibiteur) sont rigoureusement spécifiques. Ni le TPN, ni le TPNH, ni aucun de leurs analogues structuraux ne peuvent les remplacer.

Tous ces faits sont en accord avec un mécanisme d'oxydo-réduction sans toutefois le démontrer. C'est pourquoi plusieurs auteurs ont entrepris de rechercher si du tritium ou de l' ^{18}O se trouvaient incorporés dans les nucléotides uridyliques, au cours de la réaction d'épimérisation. Ces expériences ont été effectuées de trois manières : — 1) en employant de l'eau tritiée (KALCKAR et MAXWELL, 1956 ; MAXWELL, 1957 ; MAXWELL et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960) ; — 2) de l'eau contenant de l' ^{18}O (ANDERSON, LANDEL et DIEDRICH, 1956 ; KOWALSKI et KOSHLAND, 1956) ; — 3) du DPN ou du DPNH tritiés (MAXWELL, 1957 ; MAXWELL et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960.)

Toutes ces expériences utilisant l'enzyme provenant de ces trois organismes (mammifères, *L. bulgaricus*, levure) ont amené à des conclusions identiques : il n'y a, en aucun cas, aucune incorporation décelable de tritium ou de ^{18}O à partir de l'eau, du DPN ou du DPNH.

Comme cela a été discuté par tous les auteurs précédemment cités, tous les mécanismes proposés — à l'exception de l'oxydo-réduction — auraient dû conduire à l'incorporation dans les nucléotides uridyliques de l'un ou de l'autre des isotopes employés. En effet, les mécanismes de — déshydratation-réhydratation, — scission produisant un aldol suivie de rotation et recondensation, — inversion de WALDEN prise dans le sens d'un déplacement par les éléments de l'eau (H^+ ou OH^-) voir

figure 19), — passage par l'intermédiaire d'un inositol, impliquent l'échange (c'est-à-dire l'incorporation), soit d'une molécule d'eau, soit de l'un au moins de ses éléments.

L'absence d'incorporation observée dans les expériences précédemment mentionnées permet donc, sans apporter de preuve formelle d'un mécanisme d'oxydo-réduction, d'éliminer les quatre autres mécanismes envisagés.

Il est cependant nécessaire de ne pas perdre de vue que cette liste de mécanismes n'est pas exhaustive. On pourrait imaginer d'autres mécanismes dans lesquels le DPN aurait un rôle différent de celui qu'il joue dans l'oxydo-réduction, par exemple celui d'assurer la configuration de l'apo-enzyme favorable à la bonne marche de la réaction. Néanmoins, puisqu'il n'existe aucune information en faveur d'un autre mécanisme, le mécanisme d'oxydo-réduction semble, actuellement, le plus probable. Avant d'envisager d'autres hypothèses, il semble donc plus rationnel de chercher tout d'abord à soumettre l'hypothèse de l'oxydo-réduction à une critique qui permettrait de la confirmer ou de l'infirmer.

La suite de cette discussion sera, par conséquent, fondée sur l'interprétation

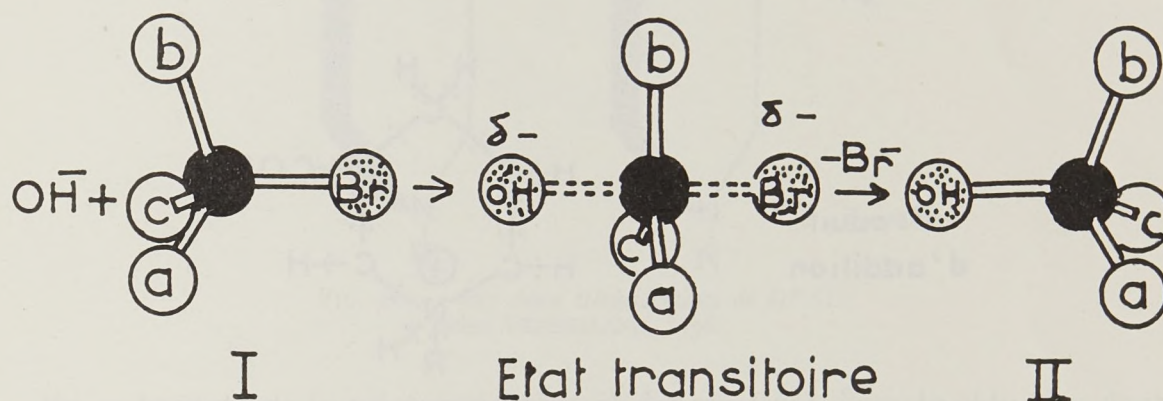


FIG. 19. — *Inversion de Walden.*
Selon FIESER et FIESER, 1950.

des expériences isotopiques, en fonction d'un mécanisme d'oxydo-réduction. Pour cela, il sera nécessaire d'exposer au préalable les résultats obtenus par l'utilisation des isotopes dans l'étude du mécanisme classique de l'oxydo-réduction, tel qu'il est catalysé par les déshydrogénases à DPN ou TPN. Les déductions qui en ont été tirées pourront être ensuite appliquées au cas de l'épimérisation.

Le mécanisme général des réactions catalysées par des déshydrogénases, étudié par PULLMAN et coll. (1954) et LOEWUS et coll. (1955), implique que deux atomes d'hydrogène sont enlevés au substrat. Le schéma le plus communément admis (voir figure 20) suggère la formation d'un composé d'addition intermédiaire entre le DPN et les deux atomes d'hydrogène, l'un en *para*, l'autre sur l'azote quaternaire. Le remaniement des doubles liaisons conduirait alors à l'expulsion du deuxième proton, l'électron se trouvant retenu sur l'atome d'azote, qui perd ainsi sa charge positive. Au cours de la réaction inverse, deux atomes d'hydrogène doivent être transférés au substrat (2 protons + 2 électrons), l'un provient du DPNH, tandis que l'autre provient du milieu. Le retour du noyau pyridinique à la forme oxydée conduit à l'apparition d'un azote tétravalent, lequel perd automatiquement un électron et acquiert le charge positive caractéristique du DPN.

Théoriquement, pour les composés pouvant exister sous formes d'isomères optiques, il devrait y avoir formation de tels isomères au cours de réactions de ce type. Cependant, les réactions de déshydrogénation classique (lactico-déshydrogénase, par exemple) ne s'accompagnent jamais d'inversion. Pour expliquer cette absence il a été nécessaire d'introduire le concept de l'« attachement en trois points » (OGSTON, 1948), selon lequel le substrat se trouve fixé sur l'enzyme de telle sorte

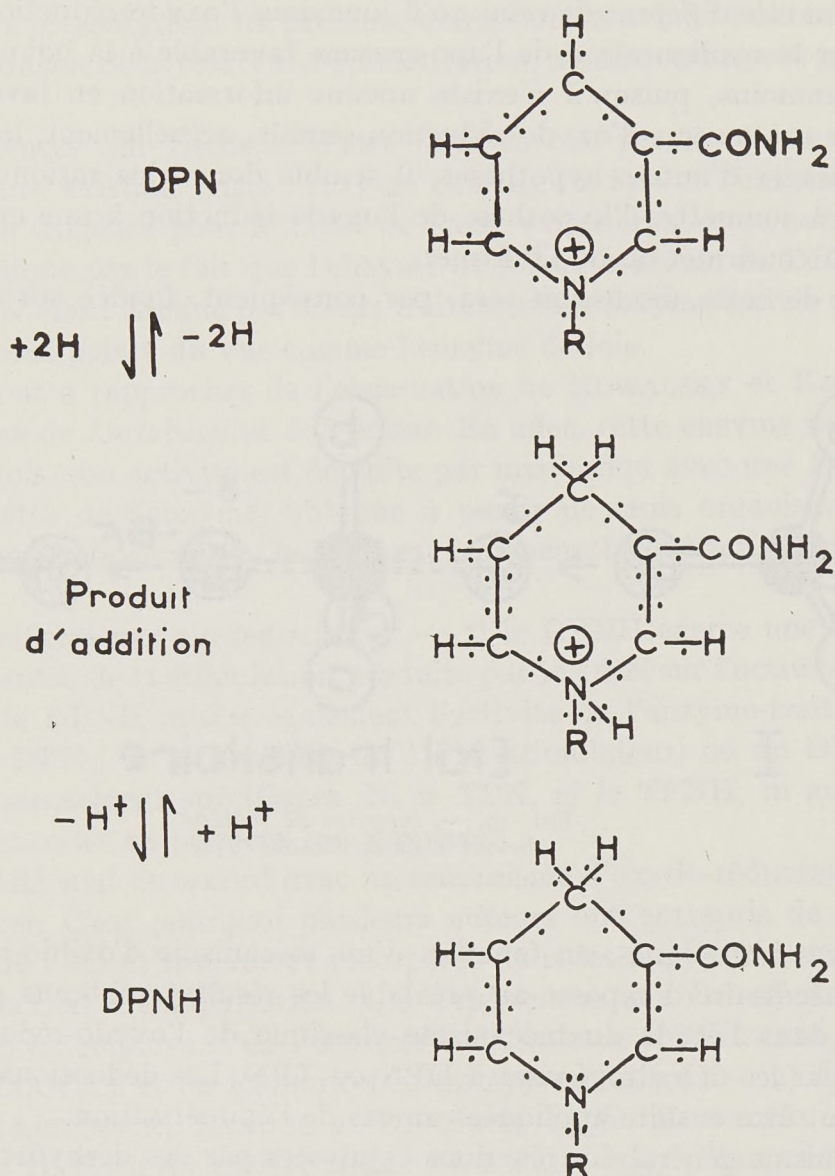


FIG. 20. — Réduction du DPN en DPNH.

que seul l'un des isomères optiques puisse réagir ou se former. On voit donc que la spécificité enzymatique peut modifier considérablement les prévisions théoriques.

Dans le cas des déshydrogénases, la stéréospécificité s'exerce non seulement vis-à-vis du substrat, mais aussi vis-à-vis du DPN. On sait, en effet, depuis les travaux de WESTHEIMER (1954) et de VENNESLAND (1958), que les déshydrogénases peuvent être classées en deux groupes selon qu'elles s'attaquent à l'hydrogène α ou à l'hydrogène β de la position *para* du DPNH, c'est-à-dire selon que l'enzyme oriente

le noyau pyridinium de telle sorte que seule l'une (ou l'autre) de ses faces soit disponible (voir figure 21).

C'est ainsi que, dans la réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase, si l'on utilise du DPNH deutéré, le deuterium transféré sur l'acétaldéhyde provient spécifiquement de l'une des deux positions, à l'exclusion de l'autre (WESTHEIMER et coll., 1951). D'autre part, des deux types d'alcool mono-deutéré, CH_3CHDOH et CH_3CDHOH , un seul est capable de transférer son deuterium au DPN (LOEWUS et coll., 1953).

Dans les expériences utilisant le tritium ou le deutérium, seuls les atomes d'hydrogène fixés au carbone sont stables, tandis que ceux fixés à l'azote ou à l'oxygène sont très rapidement échangés avec le milieu. Les transferts de protons sont donc décelables seulement lorsqu'ils sont, au départ ou à l'arrivée, fixés à un atome de carbone.

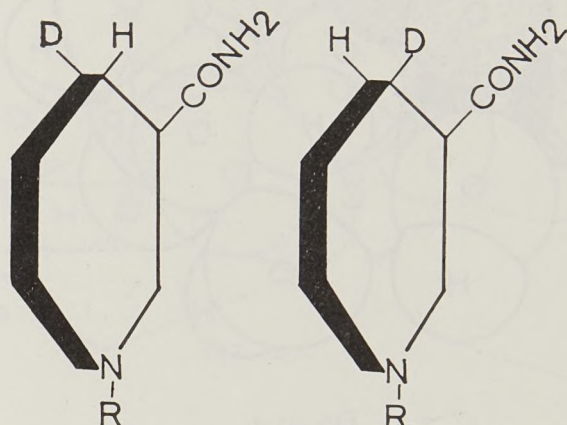
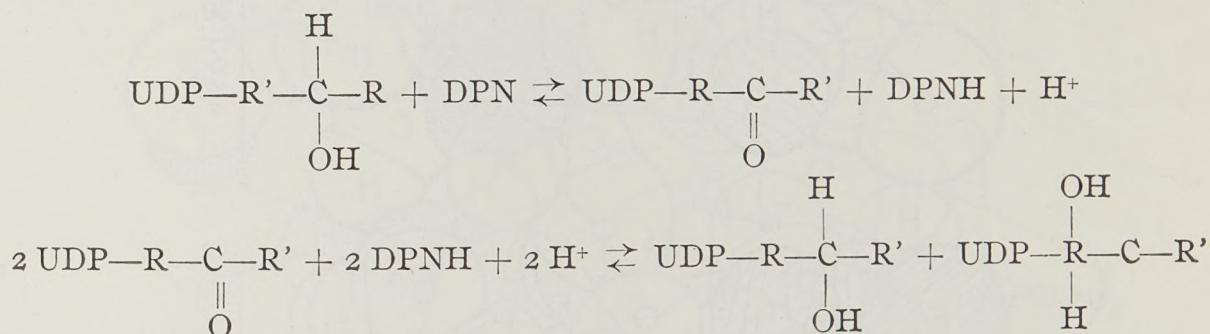


FIG. 21. — Les deux stéréoisomères de DPND.
Selon VENNESLAND, 1958.

En se basant sur le mécanisme général des réactions d'oxydo-réduction dont il vient d'être question, la réaction catalysée par l'UDPGal-4-épimérase pourrait s'écrire de la manière suivante :



L'absence d'incorporation de tritium au cours de cette réaction d'épimérisation montre que l'enzyme doit posséder vis-à-vis du DPN une stéréo-spécificité du type de celle des déshydrogénases précédemment mentionnées, c'est-à-dire que le proton, provenant du substrat et se fixant sur le DPN, est spécifiquement réintégré sur le composé intermédiaire ⁽¹⁾. Ici, toutefois, contrairement au cas des déshydrogénases

⁽¹⁾ Le fait que le DPNH soit dans les deux cas un inhibiteur de la réaction prouve qu'il a accès à l'enzyme. S'il se formait du DPNH libre, transitoirement, au cours de la réaction, on devrait s'attendre à trouver, en présence de DPNH tritié, une incorporation de tritium dans les deux hexoses. Puisque tel n'est pas le cas (MAXWELL, 1957 ; MAXWELL et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960) on doit admettre que le DPN (ou le DPNH compétiteur) sont associés à l'enzyme pendant la réaction, même dans le cas de l'épimérase de foie.

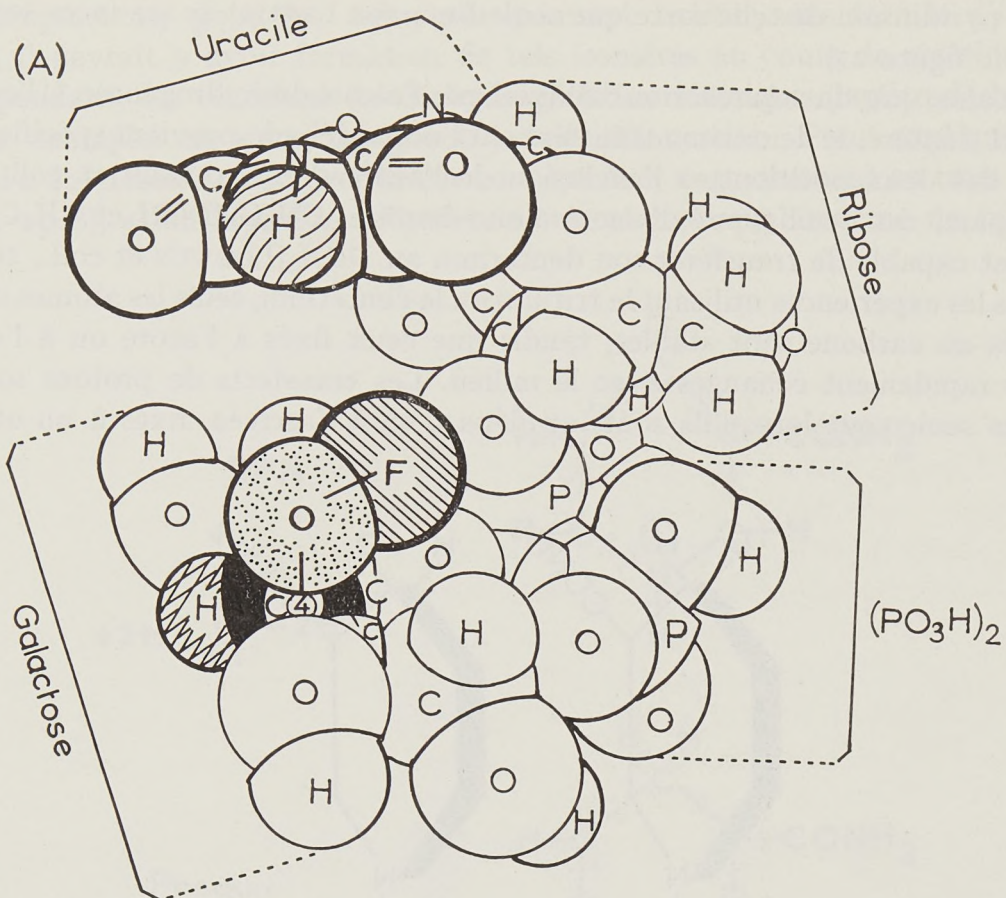


FIG. 22 a.

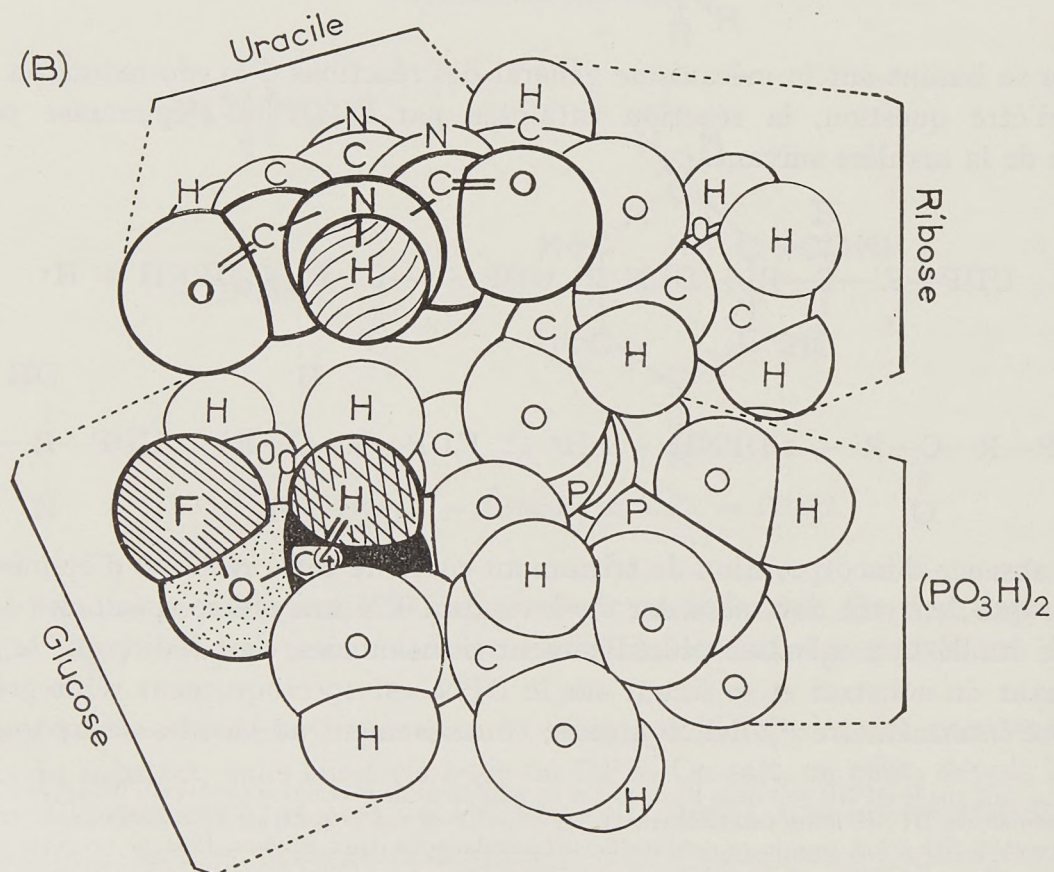


FIG. 22 b.

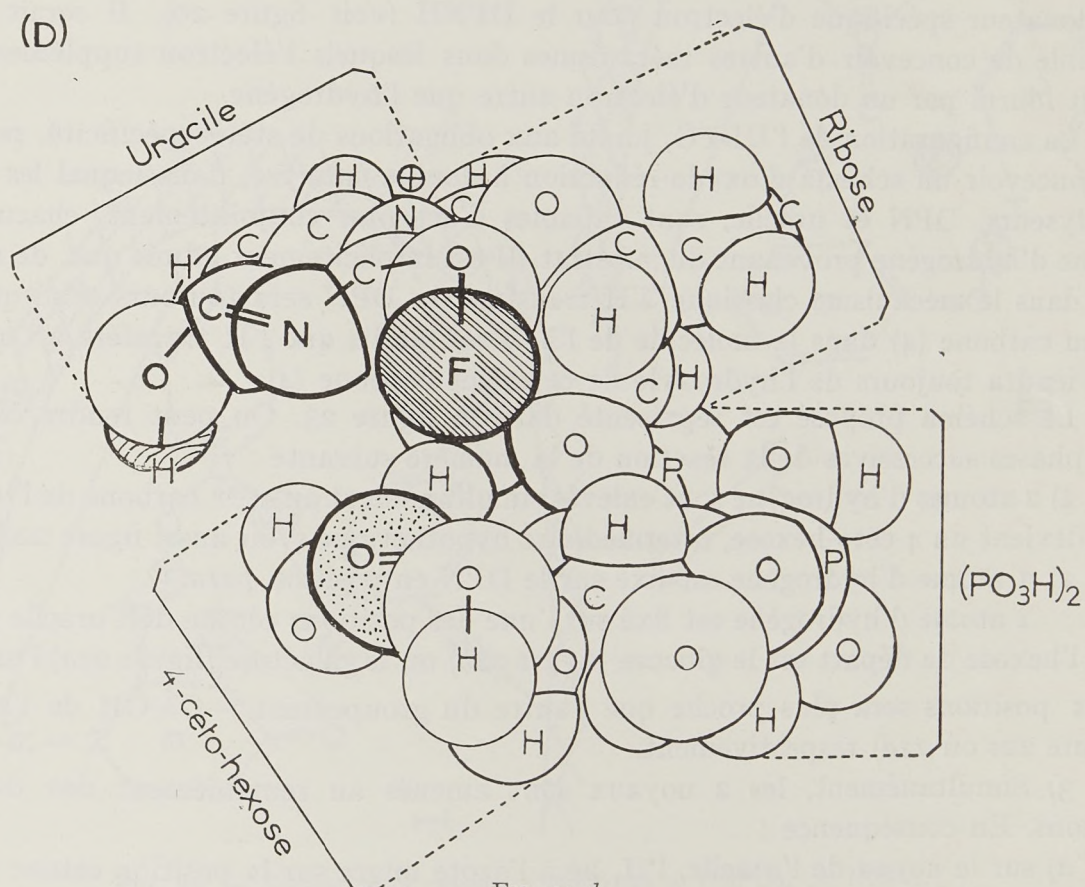
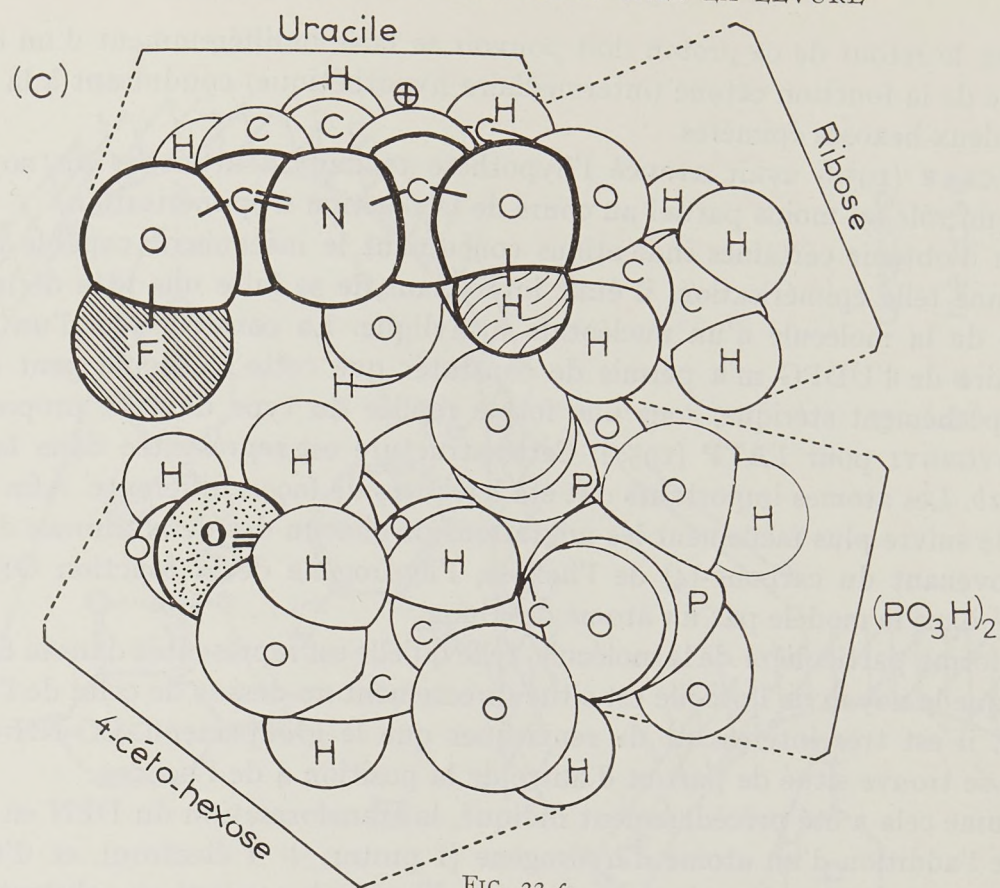


FIG. 22. — Modèle moléculaire de l'Uridine-diphospho-galactose (22a), de l'Uridine-diphospho-glucose (22b) et des nucléotides céto-hexose hypothétiques qui en dérivent (22c et 22d).

Les atomes importants ont été hachurés de façon différente. L'hydrogène de la fonction -OH du carbone (4) de l'hexose a été remplacé par un atome de fluor.

classiques, le retour de ce proton doit pouvoir se faire indifféremment d'un côté ou de l'autre de la fonction cétone (intermédiaire hypothétique) conduisant à la formation des deux hexoses épimères.

KALCKAR (1958) avait avancé l'hypothèse tendant à attribuer au noyau de l'uracile un rôle au moins partiel au cours de la réaction d'épimérisation.

Afin d'obtenir certaines indications concernant le mécanisme capable de conduire à une telle épimérisation, il était intéressant de se faire une idée de la configuration de la molécule d'un nucléotide uridylique. La construction d'un modèle moléculaire de l'UDPG m'a permis de constater que cette molécule peut exister, sans empêchement stérique, sous une forme repliée du type de celle proposée par SZENT-GYORGYI pour l'ATP (1957). Cette structure est représentée dans la figure 22a et 22b. Les atomes importants ont été hachurés de façon différente. Afin de permettre de suivre plus facilement les migrations de chacun des deux atomes d'hydrogène provenant du carbone-(4) de l'hexose, l'hydrogène de la fonction OH a été remplacé dans le modèle par un atome de Fluor.

La forme particulière de la molécule, telle qu'elle est représentée dans la figure 22 montre que le noyau de l'uracile est situé directement au-dessus de celui de l'hexose. De plus, il est très intéressant de remarquer que le groupement $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$ de l'uracile se trouve situé de part et d'autre de la position 4 de l'hexose.

Comme cela a été précédemment indiqué, la transformation du DPN en DPNH nécessite l'addition d'un atome d'hydrogène (1 proton + 1 électron), et d'un électron. On pourrait considérer le second atome d'hydrogène enlevé au substrat comme un donateur spécifique d'électron pour le DPNH (voir figure 20). Il serait alors possible de concevoir d'autres mécanismes dans lesquels l'électron supplémentaire serait fourni par un donateur d'électron autre que l'hydrogène.

La configuration de l'UDPG, jointe aux obligations de stéréospécificité, permet de concevoir un schéma d'oxydo-réduction à double catalyse, dans lequel les deux catalyseurs, DPN et uracile, sont capables d'accepter conjointement, chacun un atome d'hydrogène provenant du substrat. Il est implicitement admis que, de même que dans le mécanisme classique, l'H transféré du DPN sera toujours celui qui est lié au carbone (4) dans la molécule de l'hexose, tandis que l'H transféré à l'uracile proviendra toujours de l'hydroxyle de ce même carbone (4).

Le schéma proposé est représenté dans la figure 23. On peut rendre compte des phases successives de la réaction de la manière suivante :

1) 2 atomes d'hydrogène sont enlevés simultanément au 4^{ème} carbone de l'hexose qui devient un 4-céto-hexose, intermédiaire hypothétique (voir aussi figure 22c).

2) 1 atome d'hydrogène est fixé sur le DPN en position *para*.

1 atome d'hydrogène est fixé sur l'une des positions cétone de l'uracile (selon que l'hexose de départ est le glucose (figure 22b) ou le galactose (figure 22a) l'une des deux positions sera plus proche que l'autre du groupement $-\text{C}^{(4)}-\text{OH}$ de l'hexose (figure 22c ou 22d) respectivement.

3) Simultanément, les 2 noyaux sont amenés au remaniement des doubles liaisons. En conséquence :

a) sur le noyau de l'uracile, l'H, lié à l'azote migre sur la position cétone restée libre (figure 22c et 22d). De ce fait, l'azote (3) devient $-\text{N}^+$, et perd un électron ;

b) sur le noyau du DPN, le N^+ perd sa charge, en acquérant un électron.

4) Le groupement $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$ de l'uracile au départ, étant devenu un

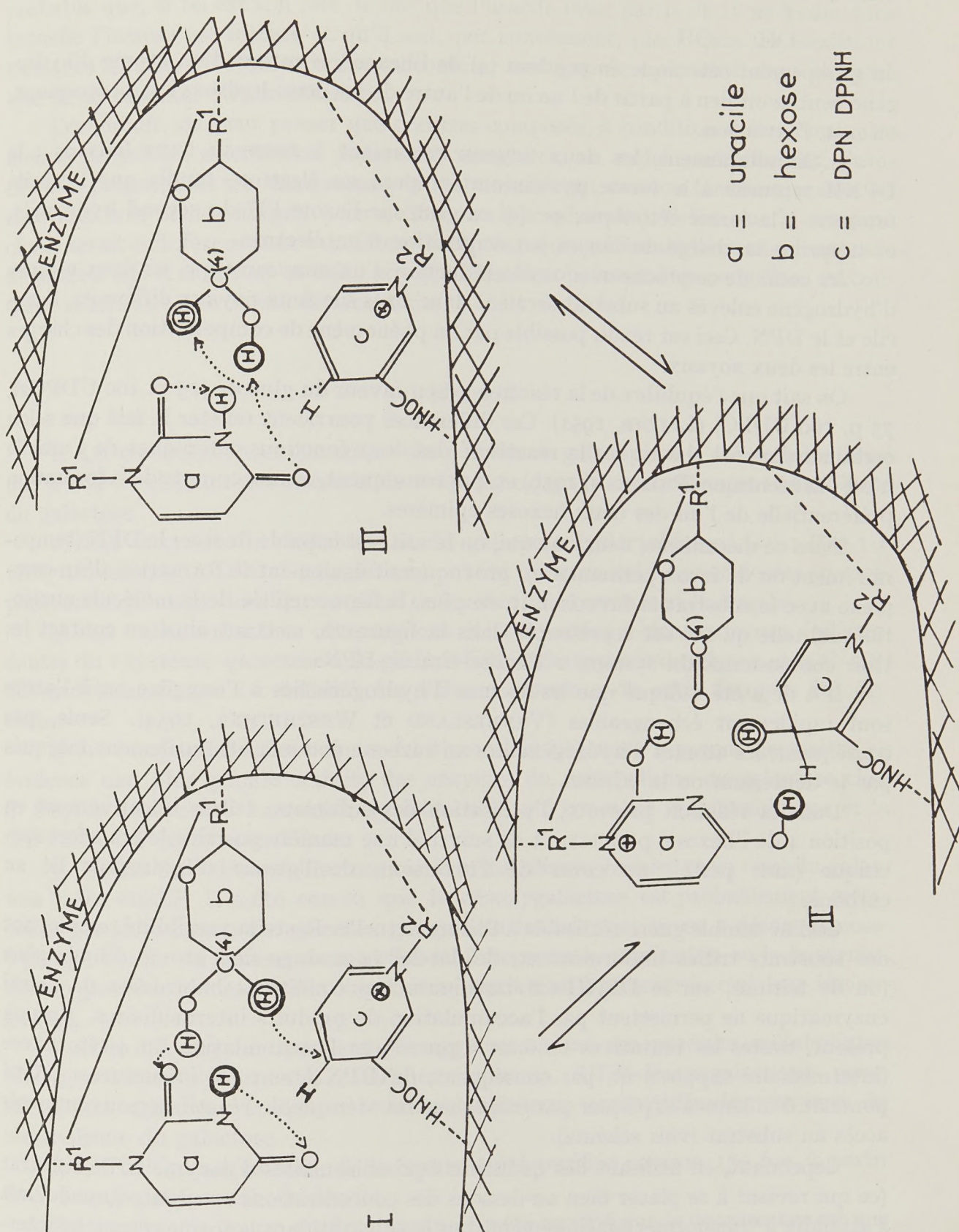
Schéma de l'épimérisation $\text{UDPGal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$ 

FIG. 23. — Schéma de la réaction d'épimérisation $\text{UDPGal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$.
Se reporter au texte.

diénol, —C=N=C— dont les deux OH sont situés à distance sensiblement égale

$$\begin{array}{c} | \quad | \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$$

du groupement cétonique en position (4) de l'hexose, le retour d'un atome d'hydrogène peut avoir lieu à partir de l'un ou de l'autre de ces deux hydroxyles, provoquant, ou non, l'inversion.

5) Simultanément, les deux noyaux remanient à nouveau leurs liaisons : le DPNH retourne à la forme pyridinium⁺ et perd un électron, tandis que l'uracile retourne à la forme cétonique, ce qui ramène sur l'azote l'H du second hydroxyle, et supprime la charge du noyau par acquisition d'un électron.

Au cours de ce processus d'oxydo-réduction d'un nouveau type, les deux atomes d'hydrogène enlevés au substrat seraient donc fixés sur deux noyaux différents, l'uracile et le DPN. Ceci est rendu possible par un phénomène de compensation des charges entre les deux noyaux.

On sait que l'équilibre de la réaction est en faveur du glucose (25 p. 100 UDPGal, 75 p. 100 UDPG) (LELOIR, 1951). Ces différences pourraient refléter le fait que selon certaines données théoriques la réactivité des deux fonctions cétoniques de l'uracile n'est pas identique (PULLMAN, 1959) et, par conséquent, rendre compte de la formation préférentielle de l'un des deux hexoses épimères.

Dans ce mécanisme, l'enzyme qui, on le sait, est capable de fixer le DPN (temporairement ou de façon permanente), provoquerait également la formation d'un complexe avec le substrat et favoriserait, de plus, la forme repliée de la molécule nucléotidique, telle qu'elle est représentée dans la figure 22, mettant ainsi en contact les trois composantes du système : Hexose-Uracile-DPN.

Il a déjà été indiqué que les atomes d'hydrogène liés à l'oxygène ou à l'azote sont rapidement échangeables (VENNESLAND et WESTHEIMER, 1954). Seuls, par conséquent, les atomes d'hydrogène liés au carbone peuvent être utilement marqués par le deutérium ou le tritium.

Dans la réaction présente, l'utilisation des substrats, tritiés sélectivement en position 4 de l'hexose, permettrait de suivre d'une manière positive le transfert spécifique (sans perte), au cours de l'inversion, de l'atome d'hydrogène lié au carbone.

Ceci ne semble guère réalisable à l'heure actuelle. Reste la possibilité, employant des substrats tritiés uniformément, de déceler le passage de l'atome d'hydrogène (ou de tritium) sur le DPNH intermédiaire. Les conditions habituelles de l'essai enzymatique ne permettent pas l'accumulation de produits intermédiaires. Jusqu'à présent, toutes les tentatives tendant à provoquer l'accumulation du 4-cétohexose (intermédiaire supposé) et, par conséquent, du DPNH, ont été infructueuses. Ceci pourrait d'ailleurs s'expliquer par empêchement stérique, le réactif ne pouvant avoir accès au substrat (voir schéma).

Cependant, en utilisant des quantités équimoléculaires d'enzyme et de substrat (ce qui revient à se placer bien au-dessous des concentrations saturantes), on devrait s'attendre à transformer pratiquement tout le substrat dans la forme cétonique intermédiaire. On devrait donc, quantitativement, retrouver sur le DPNH le tritium enlevé au substrat. Cette expérience, si elle était positive, apporterait la preuve d'un mécanisme d'oxydo-réduction et de l'intervention du DPN dans celui-ci.

Le rôle qui, dans ce mécanisme, incombe à l'uracile est d'être à la fois et de

façon réversible, accepteur d'hydrogène et donateur d'électron. Il semble hautement probable que, si tel est son rôle, le fait que l'uracile fasse partie de la molécule dans laquelle l'hexose est intégré et qu'il soit, par conséquent, placé dans les conditions stériques les plus favorables, doive lui conférer une grande spécificité dans la catalyse de la réaction d'épimérisation.

Cependant, on peut penser que d'autres composés, à condition d'être doués des mêmes propriétés essentielles, pourraient remplacer, au moins partiellement, l'uracile. En présence de tels catalyseurs, la réaction devrait pouvoir fonctionner avec les substrats non nucléotidiques (sucres libres ou phosphorylés). Selon que le composé choisi serait indifféremment « donateur-accepteur » ou préférentiellement « donateur » d'électron (*cf.* KARREMAN et coll., 1959), la réaction pourrait être complète, ou conduire seulement à la forme intermédiaire.

4.6 RÉSUMÉ

1) La composition enzymatique du « système galactose » a été exposée ainsi que le rôle de chacune des enzymes de ce système dans le catabolisme et l'anabolisme du galactose.

2) Les enzymes du métabolisme du galactose (galactokinase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, UDPGal-4-épimérase) ont été mises en évidence et dosées spectrophotométriquement chez deux espèces de levures : *S. cerevisiae* et *S. fragilis*.

3) Les valeurs absolues obtenues ont été rapportées à deux enzymes indépendantes du « système -galactose », la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la G-1-P/PP uridyltransférase. La validité des valeurs obtenues de cette façon a été discutée.

4) La comparaison des valeurs relatives ainsi obtenues a permis de mettre en évidence une plus grande activité des enzymes du métabolisme du galactose chez *S. fragilis* que chez *S. cerevisiae*, surtout en ce qui concerne la galactokinase et la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase.

5) L'effet du 2-désoxygalactose sur le métabolisme, *in vitro* et *in vivo*, du galactose a été étudié. Il a été conclu que le désoxygalactose est probablement métabolisé par les enzymes du galactose jusqu'à sa transformation en 2-désoxyglucose-6-phosphate. Le mécanisme de son effet inhibiteur sur la respiration ou la fermentation du glucose comme sur celle du galactose serait ainsi à ramener à celui du 2-désoxyglucose.

6) Il a été suggéré que le 2-désoxygalactose, ou ses produits métaboliques (désoxygalactose-1-phosphate, UDP-désoxyglucose, UDP-désoxygalactose) pourraient être utilement étudiés en tant qu'inhibiteurs compétitifs des enzymes du métabolisme du galactose.

7) L'UDPGal-4-épimérase de la levure a été purifiée environ 150 fois à partir de *S. fragilis*, et la méthode décrite.

8) L'enzyme de levure est fluorescent. Il a été montré que la fluorescence est une propriété liée à l'activité enzymatique.

9) Par traitement de l'enzyme par le PCMB, fluorescence et activité disparaissent. L'activité, mais non la fluorescence, peut être récupérée à condition d'ajouter à l'enzyme transformée, DPN et cystéine.

10) La substance responsable de la fluorescence a été identifiée, par trois méthodes différentes, comme étant du DPN lié à l'enzyme de levure.

11) Un modèle moléculaire de l'UDPG a été construit. Sur la base d'une des structures possibles de la molécule et à la lumière des faits déjà connus, le mécanisme le plus probable de la réaction d'épimérisation a été reconsidéré.

12) Un nouveau mécanisme d'oxydo-réduction, à double catalyse, a été proposé, utilisant à la fois le DPN et le noyau de l'uracile comme accepteurs des deux atomes d'hydrogène enlevés au substrat. La réaction est rendue possible à l'aide d'une compensation des charges intervenant entre les deux noyaux Uracile-nucléotidique et DPN. Deux expériences destinées à tester la validité de ce schéma ont été suggérées.

(à suivre)

COMPOSITION AZOTÉE DES VINS EN FONCTION DES CONDITIONS DE VINIFICATION

Suzanne LAFON-LAFOURCADE et E. PEYNAUD

Station agronomique et œnologique de Bordeaux

SOMMAIRE

Il est donné dans ce travail de nouveaux résultats de l'application aux vins des techniques microbiologiques du dosage des acides aminés. La comparaison aux méthodes chromatographiques, qui révèlent les seuls acides aminés libres, montre que les méthodes microbiologiques sont sensibles à certains polypeptides assimilables par les microorganismes-tests. Dans les vins analysés, la fraction polypeptidique est toujours supérieure aux acides aminés libres, qui ne représentent pas plus de 30 p. 100 de l'azote total. Dans une seconde partie, sont étudiées les conditions de vinification (celles qui influent sur la macération de la partie solide de la vendange et celles qui facilitent l'autolyse des levures), qui ont une incidence sur le taux des substances azotées, en particulier des acides aminés ; l'importance technologique de ces phénomènes est discutée.

I. — INTRODUCTION — TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les différentes formes de l'azote dans les vins, nous sont assez bien connues depuis les travaux de MUTH et MALSCH (1), qui distinguèrent l'azote ammoniacal, les protéines précipitables dans l'alcool fort, l'azote précipitable par l'acide phosphotungstique, l'azote aminé titré avec et sans hydrolyse préalable. L'application déjà ancienne, par l'un de nous, des méthodes de dosage de ces différentes fractions à un grand nombre de vins français, montra que la plus grande partie de l'azote des vins se trouve sous la forme polypeptidique (2).

Les techniques de chromatographie sur papier ont permis à de nombreux auteurs l'étude de la fraction libre des acides aminés des vins ; nous renvoyons à un récent mémoire (3) pour la bibliographie antérieure à l'année 1958. Trente-deux acides aminés ont été caractérisés de cette façon. On trouvera dans la publication précitée un tableau donnant par auteur la liste des acides aminés identifiés. On doit y ajouter aujourd'hui les travaux de BIDAN et ANDRÉ (4), qui, après BOURDET et HÉRARD (5), utilisant la méthode quantitative d'élution des spots révélés à la ninhydrine, avec mesure colorimétrique appliquée à l'éluat, ont donné les premiers chiffres sur les teneurs des vins français en acides aminés.

On peut citer encore les récents travaux suivants qui ont appliqué des techniques chromatographiques qualitatives ou semi-quantitatives.

Dans une première publication (6), COLAGRANDE a identifié dix-huit acides aminés dans les moûts et vingt-et-un dans les vins italiens, parmi lesquels la β -alanine, l'oxyproline et l'acide γ -aminobutyrique. Comparant le moût et le vin correspondant, cet auteur observe le plus généralement une diminution des taches d'acides aminés, traduisant une consommation par les levures. Un second travail plus complet du même auteur (7) est consacré à l'évolution au cours de la fermentation alcoolique dans un moût de raisins Bonarda et un moût de raisins blancs Malvoisie. Les acides aminés les plus utilisés par les levures dans ces deux moûts sont : l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glycocolle, la méthionine, l' α -alanine, la valine et l'arginine. La teneur en proline, toujours assez abondante, n'a pas été modifiée par la fermentation dans le moût de raisins rouges, ce qui est en accord avec les observations d'autres auteurs, tandis que, dans l'autre moût, cet acide aminé a été entièrement métabolisé ; on retrouve alors dans le vin ses deux dérivés : l'oxyproline et probablement la méthylhydroxyproline. Les vins jeunes laissés en contact avec les lies gagnent certains acides aminés, grâce à l'autolyse des levures ; le vin rouge s'est enrichi en acide glutamique, α -alanine et leucine ; le vin blanc en tyrosine, valine, norvaline et histidine.

En suivant l'évolution des acides aminés au cours de la fermentation de moûts des principaux cépages d'Alsace, WEISS et collaborateurs (8, 9) observent de profondes modifications dans leur composition. La diminution de la teneur en azote aminé porte essentiellement sur quatre groupes d'acides : 1^o les acides aminés à reste d'hydrocarbure : acides aminobutyriques, valine et leucine ; 2^o la phénylalanine ; 3^o les acides aminés à fonction alcool : sérine et thréonine ; 4^o le groupe glutamine, glucosamine, citrulline, formes oxydées de la méthionine. Ces deux derniers groupes sont les plus affectés. Par contre, il y a un intense développement des composés aminés soufrés du type cystéine-cystine. Le taux de certains acides aminés, tels l'arginine, les acides aminobutyriques, après avoir diminué aux premières heures de la fermentation, augmente ; la teneur en acide glutamique s'accroît également. Il y a une consommation sélective d'acides aminés et de leur métabolisme découle l'apparition ou la disparition de certains d'entre eux.

Enfin MARTINEZ a appliqué la chromatographie des acides aminés à quelques vins de Navarre (10) et DURMISHIDZE et KHACHIDZE ont suivi leur évolution dans les différents organes de la Vigne (11).

Nous reviendrons sur le travail de BOURDET et HÉRARD, car il soulève un problème important d'ordre analytique concernant la connaissance de la composition azotée des vins. Les résultats de ces auteurs contredisent en effet les données antérieures et l'opinion habituelle selon lesquelles l'azote peptidique constitue la fraction de l'azote de beaucoup la plus importante dans les vins. Les auteurs observent qu'effectivement lorsqu'on détermine quantitativement l'azote aminé par titrage en présence de formol, les bilans obtenus font apparaître que 40 à 50 p. 100 des constituants azotés du vin demeurent indéterminés et pourraient se trouver à l'état de peptides. Mais par contre si, après séparation chromatographique, on détermine individuellement la concentration de chaque acide aminé et si on calcule son équivalent en azote, on aboutit à des proportions d'azote aminé total de beaucoup supérieures à celles obtenues par titrage au formol. D'après l'interprétation des auteurs, leur étude fait apparaître que les vins rouges et blancs de consommation courante présentent une composition azotée relativement simple, dans laquelle les acides aminés libres constituent 90 à 91 p. 100 de l'azote total, les amides libres 6 à 9 p. 100,

l'ammoniaque et l'azote de nature peptidique 0,4 à 3,3 p. 100 seulement. Ce point de vue nouveau, qui bien entendu peut aussi résulter de la nature particulière des dix vins étudiés par ces auteurs, impose de nouvelles déterminations qui ont été un des objets de la présente étude.

Par ailleurs, on doit à BOURDET et HÉRARD des documents analytiques importants sur les modifications de la composition azotée des vins jeunes au contact des lies de levures, par dissolution des produits de leur dégradation autolytique. Ils observent que le contact plus ou moins prolongé des levures autolysées et du vin ne modifie pas la composition qualitative en acides aminés, mais se traduit en revanche par un accroissement notable de leur concentration. Les auteurs pensent que l'accumulation de certains acides aminés indispensables tels que l'arginine, la lysine, l'histidine et la méthionine améliore la valeur biologique des vins ainsi restés sur lie.

L'objectif principal du travail de BIDAN et ANDRÉ a été également de comparer les teneurs en azote, et en particulier des divers acides aminés, des vins jaunes du Jura, qui restent plusieurs années sur leur lie dans des fûts incomplètement pleins, avec celles d'autres vins blancs élaborés par des procédés plus classiques. Les comparaisons portant sur des vins d'origines diverses ne permettent pas toujours des conclusions suffisamment précises.

II. — FORMES DE L'AZOTE ORGANIQUE DANS LES VINS

a) DOSAGES MICROBIOLOGIQUES DES ACIDES AMINÉS

La grande sensibilité et la bonne spécificité des méthodes microbiologiques, qui par ailleurs peuvent s'appliquer directement au vin, sans autre traitement qu'une neutralisation et une dilution, en font des méthodes de choix pour le dosage des acides aminés dans ce milieu. On connaît leur principe : dans des conditions bien déterminées, la croissance de certains microorganismes hétérotrophes vis-à-vis d'un acide aminé, c'est-à-dire ayant un besoin absolu de cette substance pour se développer, est proportionnelle ou tout au moins parallèle à la teneur du milieu de culture en cet acide aminé. Les méthodes microbiologiques exigent donc pour chaque aminoacide un microorganisme spécifiquement hétérotrophe. CASTOR (12) a pu doser ainsi dix-sept acides aminés différents dans les moûts de raisin. Plus tard CASTOR et ARCHER (13) ont suivi l'évolution de ces acides aminés au cours de la fermentation alcoolique : alors que les taux de proline, sérine, glycolle, lysine, cystine demeurent pratiquement inchangés, les taux des autres acides aminés subissent d'importantes diminutions qui dans le cas de l'arginine et de la thréonine sont de l'ordre de 75 à 90 p. 100.

Après mise au point convenable, nous avons appliqué les méthodes microbiologiques au dosage des acides aminés libres d'une série de moûts et de vins. Dix-huit acides aminés ont été déterminés dans ces milieux. Ces travaux font chronologiquement suite à ceux que nous avons consacrés pendant plusieurs années à la détermination microbiologique des vitamines des moûts et des vins (1955-1958) ; l'expérience acquise dans la mise au point de ces méthodes délicates nous a servi pour le dosage, souvent plus simple, des acides aminés.

Nous avons utilisé les méthodes microbiologiques classiques, décrites dans plusieurs monographies (notamment MÜCKE (14), ADRIAN (15), BLOCK (16), notice

DIFCO). La technique générale est bien connue. On choisit un microorganisme *Leuconostoc* ou *Lactobacillus*, nécessitant absolument pour sa croissance l'acide aminé soumis au dosage. On prépare une gamme étalon contenant des quantités croissantes de cet acide dans un milieu de culture approprié, dit milieu de base. D'autre part les échantillons à doser sont dilués et amenés au pH convenable, voisin de la neutralité. On ensemence à l'aide d'une culture bien active de la bactérie lactique choisie comme microorganisme-test. Après 72 heures d'incubation à 37°C, un titrage acidimétrique de l'acide lactique formé permet d'évaluer la croissance bactérienne dans chaque milieu et de calculer par comparaison avec la gamme-étalon, la richesse en acide aminé de chaque échantillon. Pour obtenir davantage de précision, la gamme est préparée en double exemplaire et chaque échantillon est dosé sous quatre dilutions différentes.

Nous donnons ci-dessous la composition exacte du milieu de base utilisé et rassemblons dans le tableau les données relatives au dosage de chaque acide aminé.

Les souches des microorganismes sont fournies par l'American Type Culture Collections (2029 M Street N. W., Washington). Pour un certain nombre d'acides aminés nous avons utilisé les milieux de base déshydratés DIFCO.

Composition du milieu de base

Glucose	30 g
Acétate de sodium	6 g
Solution saline A	10 ml
Solution saline B	20 ml
Solution de purines	20 ml
Solution de xanthine	20 ml
Solution vitaminique A	20 ml
Solution vitaminique B	20 ml
Solution d'acides aminés non indispensables	200 ml
Solution d'acides aminés indispensables solubles dans l'eau	100 ml
Solution d'acides aminés indispensables solubles en milieu acide	100 ml
Solution de tryptophane	100 ml
Solution de cystine	100 ml

On amène la solution à pH 6,8 par addition de potasse et on complète à 1 litre.

Composition des diverses solutions

Solution saline A : 25 g phosphate monopotassique, 25 g phosphate dipotassique dans 250 ml.

Solution saline B : 20 g sulfate de magnésium, 0,5 g chlorure de sodium, 1 g sulfate de manganèse, 0,5 g sulfate ferreux, 0,1 g perchlorure de fer dans 500 ml.

Solution de purines : 100 mg adénine, 100 mg uracile, 100 mg guanine dans 100 ml contenant la quantité d'acide chlorhydrique suffisante pour la dissolution.

Solution de xanthine : 100 mg xanthine dans 100 ml de solution ammoniacale (concentration suffisante pour assurer la dissolution).

Solution vitaminique A : 2 mg thiamine, 20 mg riboflavine, 0,04 mg biotine dans 100 ml en milieu légèrement acétique.

Solution vitaminique B : 20 mg pyridoxine, 10 mg pantothénate de calcium, 10 mg acide p. aminobenzoïque, 30 mg acide nicotinique, 1 mg acide folique dans 100 ml.

Solution d'acides aminés non indispensables : 400 mg acide aspartique, 400 mg acide glutamique, 100 mg des acides aminés suivants : α -alanine, glycocolle, hydroxyproline, norleucine, norvaline, proline, sérine, tyrosine, dans 100 ml en milieu chlorhydrique.

Solution d'acides aminés indispensables solubles dans l'eau : 200 mg arginine, histidine, leucine, lysine, méthionine, thréonine, valine, dans 100 ml.

Solution d'acides aminés indispensables solubles en milieu acide : 200 mg isoleucine, phénylalanine dans 100 ml en milieu chlorhydrique.

TABLEAU I

Méthodes microbiologiques de dosage des acides aminés

Acides aminés	Méthodes et références	Technique codifiée d'après :	Gamme étalon en γ par tube
Dosages à l'aide de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> P 60 (ATCC 8042)			
Arginine.....	MC MAHAN et SNELL (1944) (17)	DIFCO	0 à 200
Acide aspartique.....	HAC et SNELL (1945) (18).	BLOCK (1956)	0 à 50
Cystine.....	BARTON-WRIGHT et CURTIS (1948) (19).	MÜCKE (1955)	0 à 50
Glycocolle.....	CAMIEN et DUNN (1950) (20).		
	SHANKMAN, CAMIEN et DUNN (1947) (21).	BLOCK (1956)	0 à 50
Histidine.....	LYMAN, KUIKEN et HALE (1947) (22).		
	HORN, JONES et BLUM (1948) (23).	ADRIAN (1955)	0 à 50
Isoleucine, leucine....	STEELE et coll. (1949) (24).	DIFCO	0 à 100
Lysine.....	Idem.	DIFCO	0 à 300
	Idem.		
Méthionine.....	BARTON-WRIGHT et CURTIS (1948) (19).	DIFCO	0 à 60
	CAMIEN et DUNN (1950) (20).		
Phénylalanine.....	HEGSTED (1944) (25).	DIFCO	0 à 100
Proline.....	BLOCK (1956) (16).	BLOCK (1956)	0 à 100
Sérine.....	MÜCKE (1955) (14).	MÜCKE (1955)	0 à 100
Tyrosine.....	BARTON-WRIGHT et CURTIS (1948) (19).	DIFCO	0 à 100
	CAMIEN et DUNN (1950) (20).		
Valine.....	SHANKMAN (1943) (26).		
	KUIKEN et coll. (1943) (27).	ADRIAN (1955)	0 à 100
	MC MAHAN et SNELL (1944) (17).		
Dosages à l'aide de <i>Lactobacillus plantarum</i> 17/5 (ATCC 8014)			
Acide glutamique....	MUCKE (1955) (14).	MUCKE (1955)	0 à 240
Thréonine.....	HORN, JONES et BLUM (1947) (28).	ADRIAN (1955)	0 à 100
Tryptophane.....	GREENE et BLACK (1944) (29).	DIFCO	0 à 12
Dosage à l'aide de <i>Leuconostoc citrovorum</i> (ATCC 8082)			
α -Alanine.....	SAUBERLICH et BAUMANN (1949) (30).	BLOCK (1956)	0 à 25
	STEELE et coll. (1949) (24).		

Les solutions de tryptophane et de cystine sont préparées chacune à 200 mg pour 100 ml ; elles sont conservées en glacière sans stérilisation préalable. Toutes les autres solutions sont stérilisées 15 minutes à 120°C. Les concentrations en acides aminés des solutions sont données pour la forme *l* ; si les acides aminés se présentent sous la forme *dl*, les quantités indiquées doivent être doublées.

Pour le dosage de l'acide glutamique, la présence de petites quantités de glutamine est nécessaire dans le milieu de base (20 mg par l). D'autre part, dans le dosage de l' α -alanine, *Leuconostoc citrovorum* exige pour sa croissance la présence de traces de leucovorine (ou facteur citrovorum).

b) COMPARAISON ENTRE LES RÉSULTATS DES MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES
ET CHROMATOGRAPHIQUES

Grâce à la collaboration de M^{lle} BLANC (Laboratoire de Chimie organique de la Faculté de Pharmacie de Paris, Professeur J. A. GAUTIER), qui a procédé aux dosages chromatographiques des acides aminés d'après la méthode de FOWDEN, et que nous tenons à remercier ici, nous avons eu l'occasion de comparer les résultats obtenus sur des vins synthétiques et sur des vins naturels par les méthodes chromatographiques et microbiologiques (31).

Lorsqu'on applique parallèlement ces méthodes, basées sur des principes entièrement différents, à des solutions simples d'acides aminés, on obtient sensiblement les mêmes chiffres, ce qui prouve bien leur validité. Toutefois, il est bien connu que la chromatographie donne les formes d+1, alors que les procédés microbiologiques ne sont sensibles qu'à la forme 1, mais bien entendu dans le vin seule la forme 1 est représentée.

TABLEAU 2
Dosages d'acides aminés dans un vin synthétique
Teneurs en mg par litre

Aminoacide	d + 1	Trouvé par chromatographie	1	Trouvé par microbiologie
Glycocolle	50	40 — 49	50	42
Phénylalanine	25	17	25	25
Thréonine	100	88 — 98	50	43
Valine	75	73 — 78	37,5	39

Par contre lorsqu'on applique ces méthodes à des vins, les résultats sont toujours très différents et les techniques microbiologiques livrent des chiffres systématiquement plus élevés que la chromatographie, comme le montre le tableau ci-dessous.

TABLEAU 3
Dosages d'acides aminés dans les vins
Teneurs en mg par litre

	Bordeaux blanc		Champagne nature	
	Chromatographie	Microbiologie	Chromatographie	Microbiologie
Alanine	24	40	20	28
Arginine	34	44		
Acide aspartique	11	17		
Acide glutamique	24	41	2	100
Cystine	13	8,4		
Glycocolle	9	49	13	89
Isoleucine + leucine	13	37	23	104
Lysine	24	40		
Phénylalanine	10	13	10	33
Proline	310	495	350	485
Sérine	7	39	10	106
Thréonine	9	86	8	120
Valine	10	34	13	70

Il est évident que la chromatographie appliquée aux vins sans hydrolyse préalable révèle seulement les acides aminés sous la forme libre. D'autre part, il a été déjà admis que les microorganismes peuvent utiliser, en plus des acides aminés libres, ceux qui sont contenus dans de petits peptides. Cela a été montré par divers auteurs qui ont constaté qu'au cours d'une hydrolyse on atteint la teneur maximale en acides aminés dosés microbiologiquement avant d'obtenir le taux le plus élevé d'azote aminé globalement titrable (32). D'autres auteurs ont observé que la croissance des souches de *Lactobacillus* est stimulée par de petits peptides. Les chiffres que nous apportons ici donnent la preuve directe que les dosages microbiologiques sont sensibles à certains polypeptides assimilables du vin. En fait ces méthodes, dans le cas actuel, ne mesurent pas une valeur chimique, mais une activité, une valeur biologiques ; leurs données sont mieux applicables à la nutrition et à la microbiologie, mais elles reflètent moins bien la composition chimique.

c) LES DIVERSES FORMES DE L'AZOTE DANS LES VINS

Les méthodes microbiologiques et chromatographiques conduisent donc à des résultats différents, mais complémentaires. Utilisées concurremment pour un même milieu naturel, et jointes aux méthodes chimiques de dosage, les deux techniques permettent en effet de mieux connaître les diverses formes de l'azote. Le tableau 4 donne la répartition des divers constituants azotés pour les deux vins précédents. L'azote aminé a été calculé d'après les données de la chromatographie et des techniques microbiologiques. Le tableau 5 reproduit encore les différentes catégories de substances azotées pour une série de vins. L'influence des conditions de vinification sur cette répartition est envisagée au paragraphe suivant.

TABLEAU 4

Diverses formes de l'azote dans les vins
Teneurs en mg d'azote par litre

	Bordeaux blanc	Champagne nature
N total	190	313
N ammoniacal	5,5	11,2
N protéique	50	60
N aminé (titrage au formol)	15	59
N aminé (chromatographie)	61	61
N aminé (microbiologie)	118	189
Polypeptides totaux	73	180
Polypeptides dosés par microbiologie	57	127
Polypeptides non dosés	16	53

Ces chiffres confirment que les acides aminés libres ne représentent qu'une faible proportion de l'azote organique, tout au moins dans les vins étudiés, et non la presque totalité comme cela a été indiqué par BOURDET et HÉRARD (5). D'après les résultats d'un grand nombre d'analyses, pour certains vins, presque tout l'azote organique (défalcation faite de l'azote protéique) est dosable par microbiologie et se trouve à l'état de petits polypeptides assimilables ; mais pour d'autres vins, il y a un reste de 100 à 300 mg d'azote polypeptidique non dosable par microbiologie

et certainement de poids moléculaire plus élevé. Si l'azote des vins se trouvait presque complètement sous la forme d'acides aminés libres, il faudrait en conclure que la fermentation alcoolique est accompagnée d'une hydrolyse profonde des formes macromoléculaires de l'azote. Or comme l'azote protéique est toujours présent dans les vins, ou tout au moins une forme macromoléculaire précipitable par l'alcool, il est rationnel d'admettre qu'existent dans les vins tous les groupes de substances azotées et pas seulement la forme dernière de l'hydrolyse.

TABLEAU 5

Diverses formes de l'azote dans les vins

Influence de certaines conditions de vinification
Teneurs en mg d'azote par litre

	N total	N ammo- niacal	N protéique	N aminé (titrage au formol)	N aminé (micro- biologie)	Polypeptides (non dosés par micro- biologie)
<i>Vins blancs 1959</i>						
8 j sur lie	190	5,5	50	15,5	122	13
20 j sur lie	236	5,5	56	29,5	144	31
60 j sur lie	258	8,5	53	39,5	164	33
Idem avec fermentation ma- lactique	263	11	56	42,5	165	31
<i>Vins rouges 1959</i>						
Avec fermentation malolac- tique :						
Cuvaïson 4 j.....	295	1,5	56	—	102	136
Cuvaïson 8 j.....	330	5,5	48	60	124	153
Sans fermentation malolac- tique :						
Cuvaïson 8 j.....	330	4,0	50	60	124	152
<i>Vins de presse correspon- dants</i>						
Cuvaïson 4 j.....	395	8,5	86,5	—	122	178
Cuvaïson 8 j.....	470	1,5	70	—	107	292

Ajoutons que le titrage au formol donne des chiffres toujours plus faibles que le taux des acides aminés libres. Cette détermination est commode, mais elle a peu d'intérêt œnologique, comme l'ont d'ailleurs souligné BOURDET et HÉRARD. L'explication de ce déficit réside peut-être dans le fait que la proline est souvent l'acide principal des vins, et que sa fonction imine ne réagit pas intégralement en présence de formol.

III. — INFLUENCE DE LA MACÉRATION ET DU SÉJOUR SUR LIE SUR LE TAUX DES ACIDES AMINÉS

Nous avons complété la documentation déjà entreprise sur les teneurs des différents acides aminés dans les vins de Bordeaux (3), en appliquant les dosages à des vins provenant d'essais de vinification de la cave expérimentale de la Station, à Saint-

Caprais de Bordeaux. Nous devons à MM. SUDRAUD et CASSIGNARD qui ont conduit ces expérimentations les divers échantillons analysés et nous les remercions de leur collaboration.

a) VINIFICATION EN ROUGE

Le tableau 6 concerne la vinification d'une même vendange de raisins rouges de l'année 1958 dans différentes conditions de cuvaïson. La fermentation s'effectue dans une batterie de petites cuves d'acier émaillé de 6 hl, dont la description a été déjà donnée (33). Les variables de l'expérience concernent la durée de cuvaïson (4 et 8 jours), la présence ou l'absence de la rafle, la fermentation en cuve ouverte ou fermée. Un essai de vinification a été conduit par chauffage à 80°C de la vendange foulée, suivi du pressurage, et fermentation du moût clair et coloré ainsi obtenu. Enfin, on a comparé la composition des vins de presse à celle des vins de goutte dans les vinifications classiques.

TABLEAU 6

Taux des acides aminés pour diverses conditions de vinification en rouge (année 1958)

Teneurs en mg d'acides aminés par litre

	Vins de goutte				Vendange chauffée vinification en moût clair	Vins de presse	
	Cuve fermée sans rafle 4 jours	Cuve fermée avec rafle 4 jours	Cuve ouverte sans rafle 4 jours	Cuve fermée sans rafle 8 jours		Sans rafle	Avec rafle
α -Alanine	10	14	10	24	10	33	31
Acide aspartique ..	18	16	12	33	0	16	16
Acide glutamique ..	35	42	41	76	40	104	101
Arginine	0	0	0	0	0	0	0
Cystine	5	5	5	8	2	15	13
Glycocolle.....	25	23	23	38	0	24	26
Histidine	11	3,6	3,6	4,5	3,8	2,8	2,9
Isoleucine	12,5	13,5	9	19	9	29,5	38
Leucine	1,0	1,0	1,0	13	0	24	21
Lysine	14	23	0	41	0	26	30
Méthionine	1,5	1,5	1,5	4,2	0	8	8,5
Phénylalanine	2,0	2,0	2,0	15	2,0	2,0	2,0
Proline	500	500	500	500	500	480	430
Sérine	50	54	46	52	40	40	36
Thréonine	126	108	240	145	62	140	123
Tryptophane	7	7	7	11,8	4,1	25	31
Tyrosine	0	0	0	0	0	0	0
Valine	19	20	20	40	19	46	40
<i>N aminé calculé ex- primé en mg de N</i>	<i>102</i>	<i>100</i>	<i>111</i>	<i>124</i>	<i>83</i>	<i>122</i>	<i>117</i>

La présence de la rafle ne modifie pratiquement pas la composition azotée du vin de goutte ou du vin de presse dans une cuvaïson à chapeau flottant d'une durée de quatre jours ; durant ce délai, les cuves ont subi un seul remontage. Le vin de la cuve ouverte se distingue des autres par une plus grande richesse en thréonine ; on note d'autres faibles différences en sens opposé pour l'acide aspartique, l'isoleucine, la lysine. Ces petits écarts peuvent résulter d'une différence d'aération, mais les

conditions de la macération ne sont pas strictement les mêmes. Dans la cuvaison en cuve ouverte, le marc a été enfoncé ; cette opération appelée foulage du marc ou « bombage » remplace le remontage par circulation du moût en fermentation pratiqué sur les cuves fermées. Il a pu y avoir de ce fait une différence dans l'importance de la macération, le bombage, qui détruit la compacité du marc, pouvant permettre un meilleur contact entre les phases liquides et solides que le remontage.

Les cuvaisons plus prolongées augmentent la dissolution d'azote sous toutes ses formes, ce qui est visible dans le tableau 5, et se traduit par une augmentation du taux de beaucoup d'acides aminés. Les différences sont très sensibles lorsqu'on compare des durées de 4 à 8 jours. On note davantage d'acide glutamique, d'acide aspartique, de valine, lysine, glycocolle, phénylalanine, leucine, isoleucine, α -alanine, tryptophane, cystine et méthionine.

La vinification pratiquée à chaud avec fermentation en moût coloré, si elle réalise une certaine dissolution des éléments des pellicules et donne un vin normalement coloré, ne permet pas d'obtenir les conditions de macération des vinifications classiques et conduit à un vin beaucoup plus pauvre, notamment en substances azotées. Mise à part la proline, le déficit est important pour tous les acides aminés, dont certains sont même absents.

Les vins de presse sont plus riches en azote que les vins de goutte correspondants, les différences étant dans le cas actuel de 100 à 140 mg par litre. Le tableau 5 montre que cette différence s'explique par un taux plus élevé d'azote précipitable par l'alcool et par davantage de polypeptides ; il y a surtout enrichissement des fractions azotées à poids moléculaire élevé. En ce qui concerne les acides aminés, on trouve dans les vins de presse davantage d' α -alanine, cystine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, valine, mais surtout d'acide glutamique et de tryptophane.

Nous avons constaté que le sulfitage de la vendange ou du moût, aux doses normales (10 g par hl), n'a pas d'incidence sur le taux d'azote du vin après la fermentation alcoolique et ne modifie pas la composition en acides aminés.

b) VINIFICATION EN BLANC

Le tableau 7 rend compte de deux expériences de séjours plus ou moins prolongés de vins blancs sur leurs lies de fermentation. Un moût homogène fermente en petites cuves de 120 litres ; la fermentation du sucre suit une marche absolument identique dans les divers récipients. Lorsqu'elle est terminée, on soutire après des temps variés de repos sur les levures ; il n'y a pas eu de remise en suspension des lies, qui pourrait faciliter la dissolution des produits d'autolyse. La fermentation malolactique n'est intervenue dans aucun des cas envisagés, le moût ayant été sulfité avant fermentation. L'évolution des acides aminés à laquelle on assiste représente donc seulement l'enrichissement par autolyse des levures et diffusion des produits solubles.

La première expérience concerne un vin normalement riche en azote et acides aminés ; la seconde, un vin anormalement pauvre ne présentant, comme acides aminés assimilables, que de la thréonine et des traces de tryptophane.

Comme il est bien connu, le séjour des vins sur lie s'accompagne d'une augmentation progressive d'azote total, d'azote aminé, de polypeptides. Le poids de substances azotées dissoutes a été dans un cas d'environ 290 mg par litre en 12 jours,

de 425 mg en 52 jours. Il y a un gain sur tous les acides aminés, sauf pour l'arginine et la proline ; l'enrichissement affecte surtout le taux de lysine (58 mg en 52 jours). Dans la deuxième expérience, le vin au début pratiquement dépourvu d'azote aminé acquiert des quantités dosables de presque tous les acides aminés en restant 52 jours sur ses levures ; c'est ici la proline et la thréonine qui augmentent le plus.

TABLEAU 7

Taux des acides aminés pour diverses conditions de vinification en blanc (année 1959)

Teneurs en mg d'acides aminés par litre

	1 ^{re} Expérience			2 ^e Expérience	
	8 j sur lie	20 j sur lie	60 j sur lie	8 j sur lie	60 j sur lie
-Alanine	10	21	26	0	11
Acide aspartique.....	26	43	54	0	25
Acide glutamique	41	69	77	0	18
Arginine	85	90	62	0	9
Cystine	14	10	22	0	2,2
Glycocolle	36	46	50	0	9
Histidine.....	13	16	20	0	4
Isoleucine	22	32	48	0	16
Leucine	22	36	46	0	12,9
Lysine	65	96	123	0	23
Méthionine	4,5	6,5	10	0	0
Phénylalanine	22	36	52	0	6,6
Proline	330	370	350	0	205
Sérine	70	55	84	0	29
Thréonine	237	247	275	89	140
Tryptophane	8,2	9,2	14,7	0,6	2,7
Tyrosine	12	22	14	0	0
Valine	28	39	44	0	24
N aminé calculé exprimé en mg de N	122	144	165	10,4	65,3

Ces résultats soulignent la grande importance des phénomènes d'autolyse des levures, dont l'œnologie pratique doit tenir compte, car ils ont certainement des incidences profondes sur la composition des vins, leur dégustation, leur conservation, leur tenue. La restitution au vin des éléments plastiques et surtout la dissolution des éléments oligodynamiques des levures ne peuvent être indifférentes à l'évolution ultérieure du vin. Ainsi le fait de laisser cuver plus ou moins longtemps, de soutirer plus ou moins rapidement et plus ou moins souvent les vins jeunes, retentit sur tout leur avenir et sur la facilité de leur conservation. L'œnologue a là un moyen d'agir sur la stabilité. Il peut chercher à épuiser le vin en éléments nutritifs pour les micro-organismes en séparant les levures très tôt et très complètement, ou au contraire rechercher grâce au séjour sur lie et à leur remise en suspension un vin plus riche en ces éléments. L'incidence de ces conditions de vinification n'est pas encore bien dégagée et ces observations constituent le point de départ de travaux susceptibles d'applications pratiques. On conçoit d'ores et déjà, par exemple, que la fermentation malolactique, et aussi les fermentations bactériennes de maladie, s'accompliront plus ou moins aisément suivant l'importance qu'aura présentée au début l'autolyse des levures. En outre le fait qu'il existe dans les récipients contenant des vins jeunes,

au niveau des lies, des zones concentrées en produits d'autolyse, doit favoriser les développements bactériens dans les lies mêmes.

IV. — INFLUENCE DES FERMENTATIONS ALCOOLIQUE ET MALOLACTIQUE SUR LES TAUX D'ACIDES AMINÉS

a) ESSAIS D'ENSEMENCEMENTS SIMULTANÉS DE MOÛTS PAR DES LEVURES ET DES BACTÉRIES

Le tableau 8 permet de connaître l'influence des levures et des bactéries malolactiques sur les taux d'acides aminés. Un moût de raisin stérilisé est fractionné en trois lots : le premier demeure stérile et donne la composition azotée au départ ; le second estensemencé par une culture pure de *Saccharomyces ellipsoideus* ; le troisième estensemencé par la même quantité des mêmes levures et en outre, simultanément, à l'aide d'une souche de bactéries malolactiques. La bactérie utilisée est un coque hétérofermentatif, transformant l'acide malique dès pH 3 et attaquant les sucres seulement à partir de pH 3,8. Les différents lots sont conservés à 25°C.

TABLEAU 8

Influence des fermentations alcoolique et malolactique sur les taux d'acides aminés

Teneurs en mg d'acides aminés par litre

	Essai n° 1			Essai n° 2		
	Moût	Après fermentation alcoolique	Après fermentation malolactique	Moût	Après fermentation alcoolique	Après fermentation malolactique
-Alanine	24	9,5	8,4	30	7,2	8,4
Acide glutamique	23	35	15	7	32	10
Arginine.....	147	23	27	132	25	22
Isoleucine	16	0	0	7,2	0	0
Leucine	13,2	4,3	2,5	2,5	6,1	6,1
Proline	500	386	380	395	270	235
Thréonine	64	53	46	45	67	54
Tryptophane	0,4	0,4	0,6	0,4	0,7	0,7
Valine	31	0	0	16	0	0

L'un de nous a montré que dans ces conditions la période d'incubation nécessaire au premier développement des bactéries correspond à peu près à la durée de la fermentation alcoolique. Les bactéries se multiplient dans un milieu sucré, encore très nutritif et pauvre en alcool. La fermentation malolactique débute alors vers la fin de la fermentation alcoolique et se poursuit très rapidement (34). On a procédé aux dosages dès la fin des transformations.

Dans l'essai n° 1, il s'agissait d'un moût de 12° Baumé, avec 2,5 g d'acide malique par litre ; l'essai n° 2 correspondait à un moût de 11° B, ayant 5 g d'acide malique. Les fermentations alcooliques et malolactiques ont été complètes.

Pendant la fermentation alcoolique on observe dans les deux moûts une consommation d' α -alanine, d'arginine, d'isoleucine, de proline, de valine. La perte est

surtout élevée pour l'arginine : 107 à 124 mg représentant environ 80 p. 100 de la teneur initiale, et pour la proline : 114 à 125 mg représentant 23 à 31 p. 100 de la richesse du moût. Par contre, il y a eu libération d'un peu d'acide glutamique.

Ces modifications ne correspondant pas exactement à ce qui a été observé par d'autres auteurs, qui avaient noté la diminution de thréonine, de l'acide aspartique, du tryptophane et parfois même la libération d'arginine et de proline. Les levures semblent intervenir de façon extrêmement variée à ce sujet et de nombreux essais s'attachant à l'étude de leur nutrition azotée sont nécessaires pour éclaircir ces phénomènes complexes.

La fermentation malolactique a modifié ici moins profondément la constitution de l'azote aminé. On note surtout la consommation d'acide glutamique, et d'un peu de thréonine ; dans un cas également d'un peu de proline. Nous verrons pour d'autres exemples des prochains paragraphes des transformations entièrement différentes.

b) FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS ROUGES

Le tableau 9 permet de comparer la constitution aminée de quelques vins rouges avant et après leur désacidification biologique. Pour deux d'entre eux l'acide malique a été fermenté à deux valeurs de pH. L'évolution des acides aminés n'a pas été partout identique et les lois du métabolisme azoté des bactéries sont aussi complexes

TABLEAU 9

Influence de la fermentation malolactique sur les taux des acides aminés

Teneurs en mg d'acides aminés par litre

	Saint-Julien 1957			Pauillac 1957			Saint-Caprais 1959	
	Témoin pasteurisé	Après fermentation malolactique		Témoin pasteurisé	Après fermentation malolactique		Avant fermen- tation malo- lactique	Après fermen- tation malo- lactique
		à pH 3,5	à pH 3,8		à pH 3,5	à pH 3,8		
α -Alanine							9	0
Acide aspar- tique							0	0
Acide gluta- mique	32	56	56	34	47	45	34	71
Arginine	24	15	14	58	14	14	0	0
Cystine							2	3
Glycocolle							0	0
Histidine							3,8	2,4
Isoleucine	11	12,6	13	16	18	17,6	12	27
Leucine	8,8	10,2	10,7	14,3	17,7	21	6,6	37
Lysine							0	0
Méthionine							1,5	15
Phénylalanine .							58	29
Proline	800	800	800	1 000	1 000	1 000	360	390
Sérine							26	0
Thréonine	129	129	105	258	220	200	80	430
Tryptophane ..	5,2	20	17,2	4,3	22	14,2	3,7	24
Tyrosine							0	0
Valine	30	26	28	30	38	38	0	0

que dans le cas des levures. Les bactéries ont consommé de l'arginine, de l' α -alanine, de la phénylalanine, de la sérine. Par contre, elles ont libéré de l'acide glutamique, un peu de leucine et d'isoleucine, nettement du tryptophane et de la méthionine. Parfois, la thréonine diminue un peu ; parfois elle augmente considérablement. Les taux de valine et de proline ne sont pas modifiés. A un pH élevé, les transformations ne sont pas plus profondes.

L'image de l'évolution des acides aminés est très différente de celle apparue au tableau 8. On comprend que suivant la constitution azotée des moûts et des vins, la nutrition des levures et des bactéries prend des aspects variés, mais on ne pouvait supposer l'importance de telles variations. Les conditions des transformations, le nombre des cellules microbiennes, la durée et l'importance des phénomènes d'autolyse, interfèrent également. Il en résulte des observations en apparence contradictoires d'une expérience à l'autre et d'un expérimentateur à l'autre. Nos essais font apparaître la grande complexité des phénomènes de la nutrition azotée des levures et des bactéries.

c) FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS BLANCS

Le tableau 10 donne un autre aspect de ces phénomènes dans le cas d'un vin blanc. On a pu suivre l'évolution de la fermentation malolactique d'un vin de la récolte 1958 conservé en cuve, en saisissant deux étapes de sa transformation : au moment où la moitié de l'acide malique a disparu et après fermentation complète.

TABLEAU 10

Influence de la fermentation malolactique sur les taux des acides aminés

Vins blancs de la récolte 1958 provenant exactement du même moût
Teneurs en mg d'acides aminés par litre

	Pas de fermentation malolactique	Fermentation malolactique à moitié	Fermentation malolactique complète
Acide malique (g)	3,0	1,5	0
α -Alanine	15,5	14,8	21
Arginine	38	42	55
Acide glutamique.....	59	58	78
Isoleucine.....	25	33	48
Leucine	26	28	42
Proline	570	550	590
Thréonine	104	144	124
Tryptophane	4,9	5,4	9,9
Valine	39	42	55

Dans cet essai, on note des augmentations plus ou moins nettes d'à peu près tous les acides aminés dosés, sans doute à cause de l'hydrolyse de polypeptides à poids moléculaire élevé. La fermentation malolactique semble donc s'accompagner d'un clivage des molécules azotées et d'une libération d'acides aminés. Cette évolution est progressive. Les bactéries causent vraisemblablement deux ordres de modifications de la composition azotée : une consommation pour la synthèse de leur

cellule et une hydrolyse plus ou moins poussée de certains polypeptides. Nous avons montré d'ailleurs (34) que les bactéries lactiques sont particulièrement riches en arginine et en lysine. Mais il est probable que dans la pratique le temps de séjour sur lie est un facteur beaucoup plus important de la teneur des vins en acides aminés que les modifications intervenues au cours des fermentations.

VI. — AUTRES DOCUMENTS ANALYTIQUES

Enfin nous rassemblons dans le tableau II quelques documents analytiques sur les acides aminés de vins blancs d'un même vignoble appartenant à des récoltes différentes et dans le tableau I2, de vins blancs provenant de vinifications séparées de cépages blancs cultivés dans la même propriété.

TABLEAU II

Taux des acides aminés dans des vins blancs de diverses récoltes

Vins provenant d'une même propriété, élaborés exactement de la même façon
Teneurs en mg par litre

	1955	1957	1958	1959
α -Alanine	43	15	15	13
Acide aspartique	54	27	25	26
Acide glutamique	80	45	44	44
Arginine	48	24	24	24
Cystine	27	11	12	12
Glycocolle	66	24	24	23
Histidine	46	11	11	11
Isoleucine	62	24	24	24
Leucine	55	23	21	21
Lysine	136	40	40	40
Méthionine	9	4,3	4,3	3,7
Phénylalanine	49	18,7	20	20
Proline	700	560	560	395
Sérine	71	40	40	52
Thréonine	148	138	283	205
Tryptophane	14	8,5	9,9	8
Tyrosine	45	17	17	14
Valine	101	33	32	32
<i>N aminé calculé exprimé en mg de N</i>	<i>207</i>	<i>126</i>	<i>144</i>	<i>115</i>

On note de fortes variations de la composition azotée suivant les années, et les taux de certains aminoacides vont de 1 à 4. Cependant le classement des acides aminés par ordre d'importance reste chaque année, à peu de chose près, le même : la proline est l'acide aminé le plus abondant, précédant la thréonine ; viennent ensuite la lysine, l'acide glutamique, la sérine. A part une certaine faiblesse relative des taux d'acide glutamique, nous constatons peu d'écart avec la constitution azotée des vins blancs déjà analysés (3). Il faudrait recueillir de très nombreux documents pour parler d'une caractéristique du cru dans la composition azotée. Il doit y avoir de profondes différences suivant les années, mais dans l'état actuel de nos connais-

sances il n'est pas possible de généraliser et d'affirmer par exemple que les vins de 1959 ont été beaucoup plus pauvres en azote que les vins de 1955.

TABLEAU 12

Vinifications séparées de cépages blancs (1959)

Vins provenant de vinifications séparées de cépages cultivés dans un même vignoble
Teneurs en mg d'acides aminés par litre

	Sauvignon	Sémillon	Muscadelle	Colombard	Merlot blanc
α -Alanine	9	5	5	5	5
Acide aspartique.....	23	18	20	25	23
Acide glutamique	23	18	18	18	23
Arginine	21	17	13	11	17
Cystine	11	6	11	1,6	6
Glycocolle	14	11	10	7	12
Histidine.....	12	8	9	5	9
Isoleucine	17	13	13	13	17
Leucine	14	9,7	9,7	8,3	14
Lysine	23	18	0	0	0
Méthionine	2	0	0	0	0
Phénylalanine	9	6,6	8	5,7	11
Proline	580	290	260	290	385
Sérine	30	27	26	21	27
Thréonine	134	140	126	133	110
Tryptophane	4,2	2,4	2,7	3,2	4,5
Tyrosine	9,7	7	7	0	8,4
Valine	27	24	0	0	27
<i>N aminé calculé exprimé en mg de N</i>	<i>114</i>	<i>74</i>	<i>64</i>	<i>65</i>	<i>81</i>

Les exemples du tableau 12 dégagent bien la diversité des taux des acides aminés d'un cépage à l'autre, cultivés sur le même sol. Les différences sont davantage d'ordre quantitatif que qualitatif, car pour chacun d'eux la somme proline + thréonine représente la fraction de beaucoup la plus importante de l'azote aminé (69 à 77 p. 100).

Enfin dans d'autres essais nous avons recherché dans quelle mesure le traitement des vins blancs à la bentonite modifiait les concentrations en acides aminés. La bentonite utilisée à la dose de 100 g par hl fixe 50 à 100 mg par litre d'acides aminés et de petits polypeptides, constitués d'arginine, thréonine, lysine, sérine et glycocolle, soit une perte d'azote aminé de 8 à 16 mg par litre.

VII. — CONCLUSIONS

Nous rendons compte dans ce travail de nouveaux essais d'application aux vins des techniques microbiologiques de dosage des acides aminés.

D'après un récent travail de BOURDET et HÉRARD, qui s'appuie sur des déterminations chromatographiques, les substances azotées des vins analysés par ces auteurs sont constituées pour 90 p. 100 d'acides aminés libres ; cette observation s'oppose aux connaissances anciennes sur la composition azotée des vins. Nous avons été amenés à comparer les résultats que donnent les méthodes chromatographiques et microbiologiques appliquées aux mêmes vins. Les premières indiquent les acides

am-nés libres ; les secondes donnent des résultats nettement plus élevés, elles expriment davantage l'activité biologique que la composition chimique ; car elles sont sensibles à certains polypeptides assimilés par les bactéries. Dans les vins analysés, la fraction polypeptidique est toujours supérieure aux acides aminés libres qui ne représentent pas plus de 30 p. 100 de l'azote total. Ces chiffres confirment nos premières observations.

Les techniques de vinification en rouge qui intensifient la macération, celles qui, également dans la vinification en blanc, prolongent le contact du vin et de ses lies de levures, se traduisent par des enrichissements importants en azote, notamment en acides aminés. Les phénomènes d'autolyse des levures et de dissolution des substances formées ont certainement des incidences profondes sur la composition, la tenue des vins et leur évolution au cours du vieillissement. Leur étude fera l'objet de nouvelles recherches.

Par ailleurs nous avons essayé de préciser les effets de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique sur l'évolution des acides aminés. Les levures modifient la constitution azotée de façon très variée, sans doute suivant la composition initiale du moût, les conditions de leur développement et de leur autolyse ; il en est de même des bactéries malolactiques. Il semble que les microorganismes causent deux ordres de modifications : une consommation pour la synthèse de leur cellule et une hydrolyse plus ou moins poussée de certains polypeptides. La restitution au cours de l'autolyse vient encore modifier le résultat de leur intervention. La nutrition azotée des microorganismes révèle ici sa grande complexité.

Enfin quelques documents sur des vinifications par cépages séparés ou de vins de différentes récoltes, sur l'azote aminé fixé par le traitement à la bentonite, complètent ce travail analytique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) MUTH F., MALSCH L. 1934. Versuche zur Aufstellung einer Stickstoffbilanz in Traubemosten und Weinen. *Z. Unters. Lebensm.*, **68**, 487.
- (2) PEYNAUD E. 1939. L'azote aminé et l'azote amidé dans les vins de Bordeaux. *Ann. Falsif. Fraudes*, **32**, 228.
- (3) LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E. 1959. Dosage microbiologique des acides aminés des moûts de raisin et des vins. *Vitis*, **2**, 45.
- (4) BIDAN P., ANDRÉ L. 1958. Sur la composition en acides aminés de quelques vins. *Ann. Technol. Agric.*, **7**, 403.
- (5) BOURDET A., HÉRARD J. 1958. Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. *Ann. Technol. Agric.*, **7**, 177.
- (6) COLAGRANDE O. 1957. Ricerca cromatografica degli amminoacidi nei mosti e nei vini. *Ann. Fac. Agrar.*, **63**, 84.
- (7) COLAGRANDE O., AMBROGGI C. 1958. Evoluzione degli amminoacidi durante la fermentazione alcoolica dei mosti di uva. *Ann. Fac. Agrar.*, **64**, 126.
- (8) WEISS H., ROUSSET A., BONNET R. 1959. L'évolution des différentes formes d'azote au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **249**, 1796.
- (9) WEISS H., ROUSSET A., MAILLARD M. T., BONNET R. 1960. L'évolution qualitative et semi-quantitative des acides aminés au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 1322.
- (10) MARTINEZ BURGÉS L. 1960. Cromatografia de algunos vinos navarros (amino-acidos libres). *Ann. Bromatol. Esp.*, **12**, 19.
- (11) DURMISHIDZE S. V., KHACHIDZE O. T. 1959. Free amino acids in the grape-wine. *IX^e Congrès Intern. Bot.*, Montréal.
- (12) CASTOR J. G. B. 1953. The free amino acids of musts and wines. *Food Res.*, **18**, 139.
- (13) CASTOR J. G. B., ARCHER T. E. 1956. Amino acids in must and wines. Proline, serine and threonine. *Amer. J. Enol.*, **7**, 19.
- (14) MÜCKE D. 1955. Einführung in mikrobiologische Bestimmungverfahren. G. Thieme, Leipzig.

- (15) ADRIAN J. 1955. Nouvelle technique pour le dosage microbiologique simultané des acides aminés indispensables et conditions de leur extraction en présence de glucides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 107.
- (16) BLOCK R. J. 1956. Amino-acid handbook. C. C. Thomas, Springfield.
- (17) MC MAHAN J. R., SNELL R. E. 1944. The microbiological determination of amino-acids. I. Valine and arginine. *J. Biol. Chem.*, **152**, 83.
- (18) HAC L. R., SNELL E. E. 1945. *J. Biol. Chem.*, **159**, 291.
- (19) BARTON-WRIGHT E. C., CURTIS N. S. 1948. A modified method for the microbiological assay of tryptophan, methionine, cystine and tyrosine. *Analyst*, **73**, 330.
- (20) CAMIEN M. N., DUNN M. S. 1950. An improved microbiological method for the determination of cystine in human urine with *Leuconostoc mesenteroides* P-60. *J. Biol. Chem.*, **183**, 561.
- (21) SHANKMAN S., CAMIEN M. N., DUNN M. S. 1947. The determination of glycine in protein hydrolysates with *Leuconostoc mesenteroides* P-60. *J. Biol. Chem.*, **168**, 51.
- (22) LYMAN C. M., KUIKEN K. A., HALE F. 1947. The histidine content of meat. *J. Biol. Chem.*, **171**, 233.
- (23) HORN M. J., JONES D. B., BLUM A. E. 1948. *J. Biol. Chem.*, **172**, 149.
- (24) STEELE B. F., SAUBERLICH H. E., REYNOLDS M. S., BAUMAN C. A. 1949. Media for *Leuconostoc mesenteroides* P-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. *J. Biol. Chem.*, **177**, 533.
- (25) HEGSTED D. M. 1944. *J. Biol. Chem.*, **152**, 193.
- (26) SHANKMAN S. 1943. *J. Biol. Chem.*, **150**, 305.
- (27) KUIKEN K. A., NORMAN W. H., LYMAN C. M., HALE L., BLOTTER L. 1943. The microbiological determination of amino acids. I. Valine, leucine and isoleucine. *J. Biol. Chem.*, **151**, 615.
- (28) HORN M. J., JONES D. B., BLUM A. E., 1948. *J. Biol. Chem.*, **172**, 149.
- (29) GREENE R. D., BLACK A. 1944. The microbiological assay of tryptophan in proteins and foods. *J. Biol. Chem.*, **155**, 1.
- (30) SAUBERLICH H. E., BAUMANN C. A., 1949. A microbiological determination of alanine. *J. Biol. Chem.*, **177**, 545.
- (31) BLANC J., LAFON-LAFOURCADE S., GAUTIER J. A., PEYNAUD E. 1961. Sur les dosages microbiologiques des acides aminés des vins. *C. R. Acad. Sci.*,
- (32) ADRIAN J. 1959. In Aminoacides, peptides, protéines, cahier n° 4, A. E. C., p. 127.
- (33) RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E. 1960. Traité d'œnologie, Tome premier. Ch. Béranger, Paris, p. 535.
- (34) PEYNAUD E., DOMERCQ S. 1959. Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification à l'aide de bactéries cultivées. *C. R. Acad. Agric.*, **45**, 355. 1961. Études sur les bactéries lactiques des vins. *Ann. Technol. Agric.*
-

CINÉTIQUE DE LA LIBÉRATION ENZYMATIQUE DU MÉTHANOL AU COURS DES TRANSFORMATIONS PECTOLYTIQUES DU RAISIN

G. MARTEAU, J. SCHEUR, C. OLIVIERI

*Station de Technologie, Centre de Recherches agronomiques du Midi,
Ecole nationale d'Agriculture, Montpellier.*

SOMMAIRE

Ce travail confirme des données précédemment acquises sur l'origine du méthanol contenu dans le jus de raisin. Ce dernier possède une pectine méthyl-estérase d'activité très importante ; une technique de mesure de cette dernière a été mise au point.

La démétoxylation des acides pectiniques conduit très vite dans le jus de raisin à un palier de la teneur en méthanol dont la valeur ne semble dépendre que de la teneur en acides pectiniques présents dans le milieu au moment de la libération du jus. Ce phénomène a conduit à une appréciation indirecte de l'activité protopectinasique naturelle du raisin et de celles de préparations commerciales d'enzymes pectiques dont on peut de la sorte, expliquer l'efficacité sur l'augmentation de rendement en jus extrait du raisin.

I. — CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA DÉGRADATION DES MATIÈRES PECTIQUES ET SUR L'ORIGINE DU MÉTHANOL DANS LE JUS DE RAISIN.

I. — INTRODUCTION

Le travail dont nous allons rendre compte doit être considéré dans le cadre plus large d'une étude qui nous paraît souhaitable, de l'ensemble des phénomènes contribuant à la libération du jus de raisin à partir des cellules qui le renferment. La connaissance plus complète de l'ensemble des mécanismes en cause serait seule capable, pensons-nous, d'apporter dans ce domaine, des éléments nouveaux susceptibles d'applications technologiques.

C'est ainsi que des opérations mécaniques telles que le foulage, l'égouttage, le pressurage, conduisent à une très grande variabilité de résultats quant aux rendements et à la qualité des résultats obtenus, qu'il s'agisse de l'obtention d'un jus destiné à la vinification ou à la fabrication de jus de raisin.

Peut-être avons-nous trop souvent tendance à mettre ces différences uniquement sur le compte du matériel, sans nous préoccuper suffisamment de la part pouvant incomber à la structure intime du fruit, au moment où il subit ces diverses opérations.

Faut-il aussi rappeler que dès après l'extraction du jus, interviennent dans ce

dernier, de profondes modifications de nature enzymatique ou non, qui notamment modifient sa structure colloïdale : le mécanisme de la formation des bourbes, la clarification spontanée du jus, sont autant de phénomènes technologiques dont les paramètres sont encore insuffisamment connus.

La rapidité des évolutions en cause est telle qu'elle nécessite le plus souvent la mise en place immédiate de l'expérimentation, l'accomplissement des analyses nécessaires, dans les minutes qui suivent l'extraction du jus.

Ces conditions, difficilement réalisables dans les laboratoires situés loin d'un vignoble, expliquent peut-être l'attention restreinte qui semble avoir été portée jusqu'à présent à ces problèmes.

Le point de départ de notre étude a été fourni, par l'expérimentation d'une préparation commerciale d'enzymes pectiques, de fabrication française, réalisée en ce qui nous concerne, surtout du point de vue de l'augmentation possible des rendements en jus, par addition du produit à de la vendange foulée.

Conformément à l'expérience déjà acquise à ce sujet, particulièrement aux U. S. A., nous avons obtenu de la sorte, à égalité de traitement d'extraction, une augmentation toujours nette, parfois très importante des rendements en jus et une facilité d'extraction nettement accrue (1).

Par quel mécanisme ces diastases d'origine externe améliorent-elles les conditions d'extraction ?

La réponse à cette question est primordiale, car elle peut nous aiguiller vers une meilleure connaissance des phénomènes intervenant naturellement, sous l'influence du propre système enzymatique du raisin.

2. — LES DIASTASES PECTOLYTIQUES

Faisons tout d'abord très brièvement, le point de nos connaissances actuelles dans le domaine des diastases pectolytiques (3), dont nous pouvons d'ores et déjà soupçonner combien est important le rôle qu'elles jouent dans le problème qui nous préoccupe.

La protopectinase

En suivant la dégradation progressive des matières pectiques à partir des protopectines insolubles qui entrent dans la constitution des parois cellulaires, c'est tout d'abord l'action d'une protopectinase transformant la protopectine en acides pectiniques solubles, qu'il nous faut envisager.

S'il est prouvé qu'une telle action enzymatique peut exister, on ne sait malheureusement pas d'une façon certaine si elle est le fait d'un enzyme absolument spécifique ; il faudrait pour éclaircir ce problème, disposer d'un substrat spécifique parfaitement défini, assurant la possibilité d'études « in vitro » parfaitement valables. A notre connaissance, un tel substrat n'existe pas encore.

Il existe incontestablement dans certains fruits, en cours de maturation par exemple, une dégradation de la protopectine avec apparition concomitante d'acides pectiniques solubles. Les hypothèses que l'on peut formuler quant à la cause de ce phénomène sont fonction de la conception que l'on a de la structure de la protopectine et des liaisons de divers types pouvant intervenir entre cette dernière et d'autres constituants de la membrane tels que la cellulose, les hémi-celluloses et la lignine.

Certains auteurs nient l'existence d'une protopectinase spécifique et admettent une extension possible à la protopectine, de l'activité de la pectine polygalacturonase. Cette conception dérive de l'assimilation que l'on peut faire de la protopectine à une chaîne polygalacturonique méthylée très longue, plus longue que celle des acides pectiniques solubles.

N'oublions pas enfin, qu'il est possible, en dehors de toute action enzymatique, de concevoir une hydrolyse de la protopectine par les acides du fruit.

La pectine méthyl-estérase ou pectine-estérase (P. E.)

Cette diastase, autrefois appelée « pectase », catalyse spécifiquement l'hydrolyse des groupements méthoxyles fixés sur les acides pectiniques. Elle est très répandue aussi bien chez les végétaux supérieurs que chez certaines moisissures.

Les enzymes extraits des végétaux supérieurs ont des propriétés assez différentes de ceux d'origine fongique. C'est ainsi que l'activité des premiers croît en même temps que le pH jusqu'aux environs de pH 8 où peut intervenir une déméthoxylation provoquée par l'alcalinité du milieu ; notons cependant que l'augmentation de la concentration saline provoque une nette activation dans la zone des plus bas pH et abaisse généralement de la sorte, le pH optimum.

Une propriété très marquante de la P. E. des végétaux supérieurs est une très grande résistance à beaucoup d'agents chimiques et à des élévations modérées de la température.

Les P. E. d'origine fongique ont un pH optimum d'action beaucoup plus bas (4,5 à 5), sont beaucoup moins activables par les sels et beaucoup plus sensibles à la température.

Nous serons amenés à discuter plus loin des méthodes de détermination de l'activité P. E. et à étudier quelques aspects intéressants de l'activité de cet enzyme dans le raisin.

La pectine polygalacturonase (P. G.)

Cette diastase, anciennement appelée « pectinase », catalyse l'hydrolyse de la liaison glycosidique 1-4 qui réunit entre eux les maillons de la chaîne polygalacturonique.

Le véritable substrat de la (P. G.) dont l'action est très spécifique (5), est constitué par l'acide pectique résultant de la déméthoxylation des acides pectiniques par l'enzyme P. E. (4) ; son action dans le processus de dégradation des pectines fait donc logiquement suite à celle de la pectine estérase. Il pourrait cependant exister plusieurs types de P. G., variant selon leur aptitude à hydrolyser des chaînes polygalacturoniques plus ou moins méthylées ou à pousser plus ou moins loin la dégradation de ces dernières.

3. — LE MÉTHANOL DANS LE JUS DE RAISIN EN RELATION AVEC LA DÉGRADATION DES MATIÈRES PECTIQUES

Connaissant les aptitudes respectives des divers enzymes pectolytiques pouvant se trouver en mélange dans une préparation commerciale, nous sommes maintenant en mesure de poser d'une façon plus précise, le problème envisagé plus haut.

Par quel mécanisme, cette préparation commerciale, que par commodité nous appellerons désormais P. c., facilite-t-elle la libération du jus à partir d'une vendange foulée?

Nous savons que l'action conjuguée des enzymes P. E. et P. G. conduit à une dégradation des pectines solubilisées dans le jus, s'accompagnant d'une diminution très importante de la viscosité de ce dernier. Cette diminution de viscosité doublée d'une très nette amélioration de la filtrabilité constitue d'ailleurs l'un des effets favorables les plus classiquement recherchés par l'emploi des diastases pectolytiques. Dans le travail cité plus haut (1), nous avons vérifié que P. c. ne faisait pas exception à cette règle.

Nous pouvons donc fort bien concevoir l'amélioration de rendement en jus comme liée à la diminution de la viscosité de ce dernier facilitant son écoulement lors de l'égouttage ou du pressurage de la vendange.

Mais nous pouvons tout aussi bien envisager la présence dans P. c. ; d'une activité protopectinase contribuant à la destruction de la protopectine incluse dans les membranes cellulaires, la désagrégation de ces dernières libérant plus facilement le jus encore emprisonné à la suite des traitements mécaniques subis par la vendange.

Il nous a paru intéressant de rechercher laquelle de ces deux hypothèses était la bonne, car la vérification de l'une ou l'autre nous apporterait une meilleure connaissance du mécanisme intime de la libération du jus, sous l'influence des traitements mécaniques, et en présence du système enzymatique naturel du raisin.

Nous avons vérifié, au cours des essais technologiques du produit P. c., que l'augmentation de rendement en jus fourni par la vendange, s'accompagnait toujours d'une augmentation du taux de méthanol retrouvé dans le jus. Il était donc intéressant de rechercher quelle était la raison de cette corrélation.

Quelle est donc l'origine du méthanol?

Quelques données essentielles concernant la présence du méthanol dans le jus de raisin et le vin étaient déjà acquises dès 1934 à la suite des travaux de M. FLANZY (11).

Ces dernières années, des connaissances nouvelles et fort intéressantes sont intervenues concernant l'origine de cet alcool ; il faut en voir la cause dans l'amélioration des méthodes de dosage.

Il s'agit en particulier de microméthodes colorimétriques très sensibles, dérivées de la méthode anciennement décrite par DÉNIGES (10), basées sur l'oxydation ménagée du méthanol en aldéhyde formique. Ces méthodes ont été mises au point par G. BERTRAND et SILBERSTEIN (6), TAVERNIER et JACQUIN (7). M^{me} L. BOUZIGUES a préconisé une variante de cette dernière méthode consistant à remplacer, pour la mise en évidence colorimétrique du méthanol, le réactif de SCHIFF par l'acide chromotrope plus sensible.

La possibilité ainsi offerte d'effectuer en série, des dosages avec une sensibilité suffisante, a permis d'apporter quelques précisions concernant les modalités de la présence du méthanol dans le vin.

G. BERTRAND et L. SILBERSTEIN (6) en trouvent des doses comprises entre 38 et 200 mg/l., davantage dans les vins rouges que dans les vins blancs.

P. FRANCOIS et P. GEOFFROY (9) opérant sur de très nombreux échantillons trouvent des doses moyennes de cet ordre de grandeur, celles-ci pouvant atteindre plus de 350 mg par litre dans les vins rouges de certains hybrides.

Ces derniers auteurs mettent nettement en évidence l'importance du mode de vinification et en particulier celle de la macération en présence des matériaux solides de la vendange et particulièrement des pellicules.

Plus récemment M. FLANZY et M^{lle} Y. LOISEL (12), puis M. FLANZY et M^{me} L. BOUZIGUE (13) ont attiré l'attention sur la libération très rapide du méthanol dans le jus de raisin dès son extraction et sur l'action pratiquement nulle à cet égard, de la fermentation alcoolique.

Ces données fondamentales laissent immédiatement prévoir l'action rapide d'une pectine méthyl-estérase arrachant le méthanol aux acides pectiniques, par un phénomène voisin de celui récemment démontré par P. JACQUIN dans le cas du cidre (14).

II. — LA CINÉTIQUE DE LA LIBÉRATION DU MÉTHANOL DANS LE JUS DE RAISIN. APPLICATIONS

La première partie de notre travail a consisté à préciser les données antérieurement acquises, en étudiant la cinétique de la libération du méthanol dans le jus de raisin, après son extraction, sous l'influence de ses propres diastases ou de diastases d'origine externe.

Nous avons choisi comme technique de dosage la micro-méthode colorimétrique de P. JACQUIN et J. TAVERNIER déjà citée en référence (7), et dont nous nous dispensons de citer le mode opératoire que nous avons strictement appliqué ; les densités optiques étaient cependant mesurées, après une heure seulement de séjour des tubes au thermostat à 35°.

Nous croyons aussi devoir signaler, que la fuschine utilisée était de la fuschine basique R. A. L. Kuhlmann, une fuschine différente nous ayant donné des résultats défectueux qui pourraient peut-être expliquer d'autres échecs signalés ailleurs (8).

I. — MESURE DE LA PRÉCISION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DU MÉTHANOL

Dans un premier essai, un moût de raisin contenant initialement 43 mg de méthanol par litre a été partiellement évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif, à une température de 55°C.

Le dosage du méthanol dans le résidu, après l'avoir complété au volume initial, a fourni 5 mg de méthanol par litre.

Plusieurs fractions du liquide obtenu ont été ensuite additionnées de quantités croissantes et exactement mesurées, du méthanol purifié utilisé pour la confection de la gamme colorimétrique.

Le méthanol a ensuite été dosé dans ces différentes fractions.

Le tableau I confronte avec la quantité de méthanol théoriquement contenu dans le liquide, celle que nous avons déterminée par dosage ; il indique également les résultats obtenus lors d'un deuxième essai, réalisé dans un autre moût, sans élimination préalable du méthanol.

Nous constatons donc une erreur relative plus importante pour les plus faibles doses de méthanol, mais dans tous les cas, celle-ci demeure inférieure à 5 p. 100.

TABLEAU I

	1 ^{er} essai			2 ^e essai		
	Méthanol mg./l.			Méthanol mg./l.		
	Théorique	Dosé	Erreur relative	Théorique	Dosé	Erreur relative
Témoin.....		5			36	
+ 50 mg/l	55	52,5	4,5 %	86	82,4	4,2 %
+ 100 mg/l	105	108	2,9 %	136	132,3	2,7 %
+ 200 mg/l	205	206,5	0,7 %	236	239	1,2 %
+ 500 mg/l	505	509	0,8 %	536	546	1,8 %

2. — ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN MÉTHANOL DANS LES JUS SÉPARÉS DE LA MATIÈRE SOLIDE

a) Jus de goutte et jus de presse. Influence des bourbes.

Nous avons tout d'abord étudié les conditions de libération du méthanol dans des jus de goutte et des jus de presse provenant de la même vendange. Ces jus, comme tous ceux de notre expérimentation, ont été conservés à la température ambiante, en présence de 1,5 g par litre de benzoate de soude ; nous avons préalablement vérifié que cet antiseptique ne perturbait pas le dosage du méthanol.

Nous avons de plus étudié, l'influence que pouvait avoir sur la libération du méthanol, le maintien prolongé sur les bourbes ou l'élimination rapide de celle-ci par centrifugation.

Les tableaux 2 et 3 précisent l'influence de ces facteurs au cours de deux essais différents réalisés avec du jus de Carignan.

La conclusion essentielle qui ressort de l'examen de ces tableaux et des courbes de la figure 1, est l'apparition d'un palier présenté par la dose de méthanol libéré dans le jus, au bout d'un temps d'évolution après la cueillette de l'ordre de 24 heures.

L'allure purement diastatique de ce phénomène est prouvée par la dernière ligne du tableau 3 relative à un moût chauffé pendant 2 minutes à 80° (1), immé-

TABLEAU 2

Méthanol mg/l.

Temps écoulé après la séparation du jus	2 h.	18 h.	42 h.	68 h.	10 jours
Jus de goutte sur bourbes.....	18	49	54	52	52
Jus de presse sur bourbes.....	18	44	42	43	43
Jus de goutte centrifugé.....	18	50	51,5	51	50
Jus de presse centrifugé.....	15	40	42	42	41,5

(1) 6 minutes de chauffage ont été nécessaires pour amener la température à 80°.

TABLEAU 3

Méthanol mg/l.

Temps écoulé après la séparation du jus	15 mn	2 h.	5 h.	8 h.	24 h.	48 h.	8 j.	15 j.
1 - Jus de goutte sur bourbes.....	20	28	43	50	60,5	61	61,5	
2 - Jus de presse sur bourbes.....	18	25	35	44	53,5	56	57	56
3 - Jus de goutte centrifugé.....	22	28,5	41	51,5	57,8	52	56	
4 - Jus de presse centrifugé.....	20,5	25,5	35	43	51,5	51	48,5	50
Jus de goutte chauffé à 80°.....	22		20	21,5	23	22		

diatement après l'extraction du jus : l'inactivation de la pectine-méthyl-estérase se traduit par un arrêt immédiat et définitif de la libération du méthanol.

Dans les deux cas considérés, le palier atteint par le jus de goutte a dépassé légèrement, il est vrai, celui atteint par le jus de presse.

Le maintien des jus sur leurs bourbes a augmenté légèrement la valeur du palier, d'une façon beaucoup plus significative dans le second cas que dans le premier.

b) *Influence de l'alcool éthylique*

En dehors de l'influence propre de la fermentation alcoolique et du métabolisme des levures qui mérite une étude plus approfondie en raison des données divergentes fournies par l'expérimentation à ce sujet, il nous a paru souhaitable de connaître l'influence propre de l'alcool éthylique présent dans le milieu sur la libération enzymatique du méthanol.

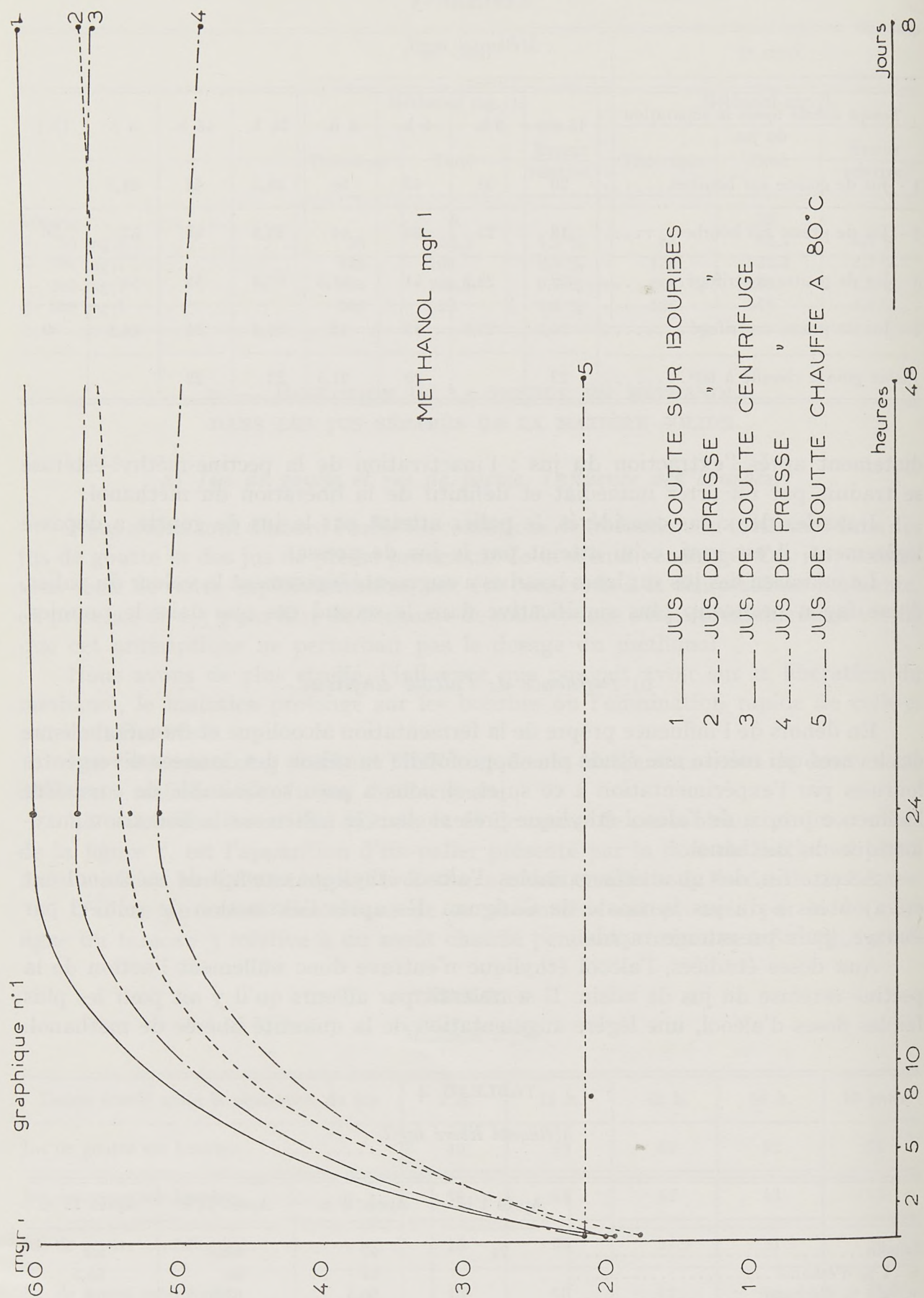
A cette fin, des quantités variables d'alcool éthylique exempt de méthanol ont été ajoutées à du jus benzoaté de Carignan dès après l'extraction de celui-ci par foulage, puis pressurage rapide.

Aux doses étudiées, l'alcool éthylique n'entrave donc nullement l'action de la pectine estérase du jus de raisin. Il semblerait par ailleurs qu'il y ait pour les plus faibles doses d'alcool, une légère augmentation de la quantité libérée de méthanol.

TABLEAU 4

Méthanol libéré mg/l.

	Après 1 h.	Après 8 h.	Après 24 h	Après 32 h.
Témoin.....	24	47	64	63
+ 1 % d'éthanol.....		48	64	65,5
+ 2,5 % d'éthanol.....		50,5	67,5	68
+ 5 % d'éthanol.....		48	60	60
+ 10 % d'éthanol.....		44	60	60



c) *Influence de l'addition de diastases pectolytiques d'origine externe.*

Dans quelle mesure, l'addition au moût, de diastases pectolytiques d'origine externe, modifie-t-elle la vitesse de libération du méthanol et la valeur du palier atteint par l'accumulation de ce dernier ?

Dans quelle mesure, la pectine-estérase contenue dans le mélange peut-elle se substituer éventuellement à la P. E. du raisin ?

L'expérimentation suivante répond à ces questions.

Des quantités croissantes du mélange commercial P. c. ont été ajoutées d'une part à du jus de Carignan dès son extraction, d'autre part au même jus porté à 80° pendant 2 minutes, en vue d'inactiver la pectine-méthyl-estérase naturelle.

Les résultats du tableau 5 et la figure 2 montrent que :

TABLEAU 5
Méthanol libéré (mg/l.)

Temps écoulé après séparation ..	25 mn	1 h	5 h	24 h	48 h	8 j	45 j
Témoin non chauffé	9		27	50	51	51	50,5
Témoin + P. c... { 0,2 g/l.			33	49,5	49		
{ 0,4 g/l.			34,5	50,5	49,5		
{ 0,8 g/l.			36	49,5	49,5		
Témoin chauffé à 80 °		15	15	15,5	14,5	14	
Témoin + P. c... { 0,2 g/l.			17	20	21,5	37	48
{ 0,4 g/l.			17,5	22	27	44	52
{ 0,8 g/l.			19	29	33	45,5	50

1. — L'addition du produit P. c. au moût non chauffé a contribué à rendre plus rapide la libération du méthanol, mais le palier atteint est demeuré le même que celui fourni par le témoin.

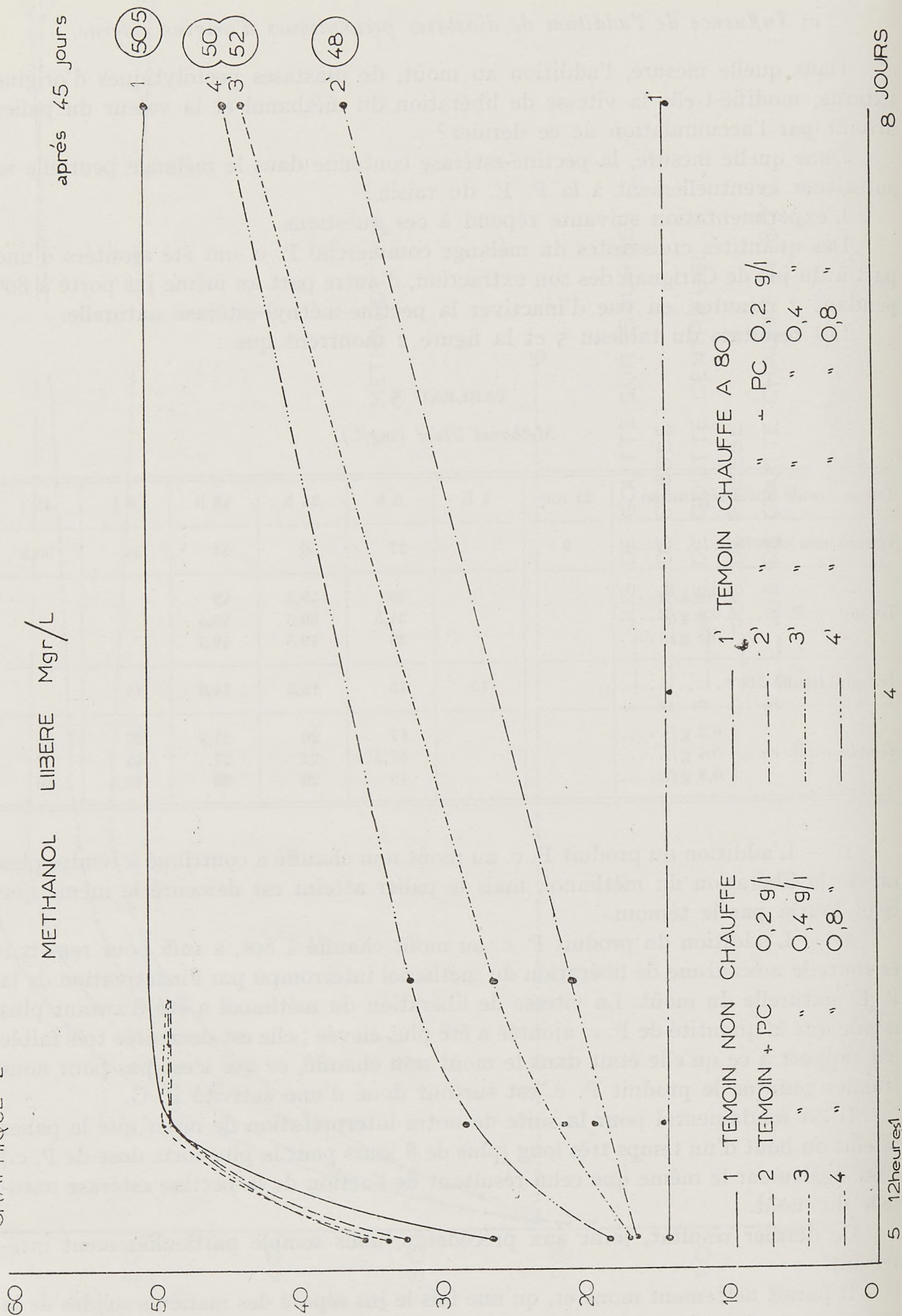
2. — L'addition du produit P. c. au moût chauffé à 80°, a suffi pour remettre en route le mécanisme de libération du méthanol interrompu par l'inactivation de la P. E. naturelle du moût. La vitesse de libération du méthanol a été d'autant plus rapide que la quantité de P. c. ajoutée a été plus élevée ; elle est demeurée très faible par rapport à ce qu'elle était dans le moût non chauffé, ce qui n'est pas pour nous étonner puisque le produit P. c. est surtout doué d'une activité P. G.

Il est fondamental pour la suite de notre interprétation de noter que le palier atteint au bout d'un temps très long (plus de 8 jours pour la plus forte dose de P. c.) a été également le même que celui résultant de l'action de la pectine estérase naturelle du moût.

Ce dernier résultat, joint aux précédents, nous semble particulièrement intéressant.

Il paraît nettement montrer, qu'une fois le jus séparé des matières solides de la vendange, la dose de méthanol atteinte dans celui-ci n'est conditionnée que par le stock d'acides pectiniques se trouvant dans le jus au moment de l'extraction.

GRAPHIQUE 2



Ces derniers sont immédiatement déméthoxylés par la P. E. du jus, à moins que celle-ci ne soit inactivée *immédiatement* par un chauffage approprié.

Ce phénomène peut conditionner une application technologique importante.

Nous avons en effet constaté que les jus chauffés immédiatement après leur extraction étaient caractérisés par une turbidité permanente :

La déestérification des acides pectiniques par la P. E. du moût joue donc un rôle appréciable dans le mécanisme de la formation des bourbes qui semble tout au moins en partie, lié à la précipitation de l'acide pectique ou de ses sels.

Il convient aussi de noter que dans ces conditions l'appréciation dans les jus de raisin, des pectines sous leurs différentes formes, dépend essentiellement du moment où les contrôles analytiques sont réalisés, ce qui n'est que rarement précisé. De toutes façons, cette instabilité des acides pectiniques contribue aussi à expliquer les doses relativement faibles de pectine vraie retrouvée dans les moûts de raisin, comme le montrent en particulier les résultats obtenus par PEYNAUD (15) grâce à la méthode précise de dosage des diverses formes de pectine mise au point par cet auteur, ceux également obtenus par P. FRANCOT et P. GEOFFROY (16).

3. — INFLUENCE DE LA MACÉRATION DES MATIÈRES SOLIDES DANS LE JUS EN PRÉSENCE OU NON DE DIASTASES PECTOLYTIQUES

Nous savons que la macération des matières solides dans le jus, si elle est suffisamment prolongée, tend à augmenter la libération du méthanol dans le jus. Cela ressort nettement des travaux déjà cités en référence de P. FRANCOT et GEOFFROY (9), de M. FLANZY et M^{lle} LOISEL (12), de M. FLANZY et M^{me} L. BOUZIGUES (13).

Pour notre part, nous avons surtout voulu étudier cette évolution du taux de méthanol, en vue de rechercher une solution indirecte au problème que nous nous sommes fixés au début :

Nous désirions savoir si un accroissement du taux d'extraction de jus, par exemple sous l'influence d'une addition de diastases pectolytiques, pouvait être lié à une hydrolyse de la protopectine des parois cellulaires ou pour employer un terme plus vague, à une désagrégation du ciment pectocellulosique intercellulaire.

Le contrôle du taux de pectine solubilisé dans le jus, pourrait paraître à première vue, la méthode de choix.

En fait, nous avons vu combien devait être instable ce taux de pectine, en raison de l'action immédiatement rapide de la P. E. du moût.

Il nous a semblé au contraire, que le contrôle du taux limite de méthanol, dans les jus ayant subi des macérations plus ou moins prolongées, pouvait constituer la meilleure image de la quantité de pectine ayant été solubilisée.

Sans doute, ne s'agit-il que d'une partie de la pectine que l'on décèle ainsi, celle qui est transformable par la P. E. du moût ; il est cependant logique de penser qu'il y a proportionnalité entre cette fraction et l'ensemble de la pectine solubilisée.

Nous avons donc réalisé l'expérimentation suivante :

De la vendange de Carignan a été foulée, puis le jus séparé par égouttage et pressurage rapide.

La moitié du jus a été conservée telle quelle, l'autre moitié a été additionnée du produit. P c., sur la base de 0,8 g par kg de vendange entière initiale.

A partir des jus additionnés ou non de P. c., ont été reconstitués des lots de vendange entière, conservés à la température ambiante.

Nous avons suivi (tableau 6), l'évolution du taux de méthanol d'une part dans les jus seuls, d'autre part dans les jus ayant macéré pendant des temps variables au contact des matières solides. Pour ces derniers, la colonne A indique la dose de méthanol au moment de la séparation du jus, la colonne B la dose de méthanol une fois la limite de cette dernière atteinte après 6 jours supplémentaires de conservation des jus.

TABLEAU 6

Méthanol libéré mg/l.

Durée de la conservation avec ou sans macération.	7 heures		24 heures		48 heures		4 jours		6 jours	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Jus seul.....	30		43		47		48		50	
Jus + P.c.....	37		49		48		50		50	
Vendange entière foulée.....	40	68	79,5	92	104		122	132	152	
Vendange entière foulée + P.c.	53	86	91	115	130		152	155	177	

Méthanol libéré sous l'influence de la macération.

($x - x_0$) mg/l.

	7 heures	24 heures	4 jours
Vendange entière.....	18	42	82
Vendange entière + P.c.	36	65	105

En ce qui concerne les jus seuls, nous vérifions une fois de plus, l'obtention d'un palier atteint au bout de 48 heures dans le jus sans P. c., au bout de 24 h. dans le jus additionné de P. c.

Nous vérifions aussi que l'addition de P. c. ne modifie pas la dose limite de méthanol (50 mg/l).

La macération provoque une augmentation très importante du taux de méthanol.

Le tableau 7 et la figure 3 représentent l'évolution de la différence ($x - x_0$) des taux limites de méthanol, obtenus dans les jus, respectivement au bout d'un temps t de macération, et du temps 0 (jus seul).

Ces derniers résultats mettent bien en évidence l'influence propre de la macération sur la dose limite de méthanol libéré dans les jus.

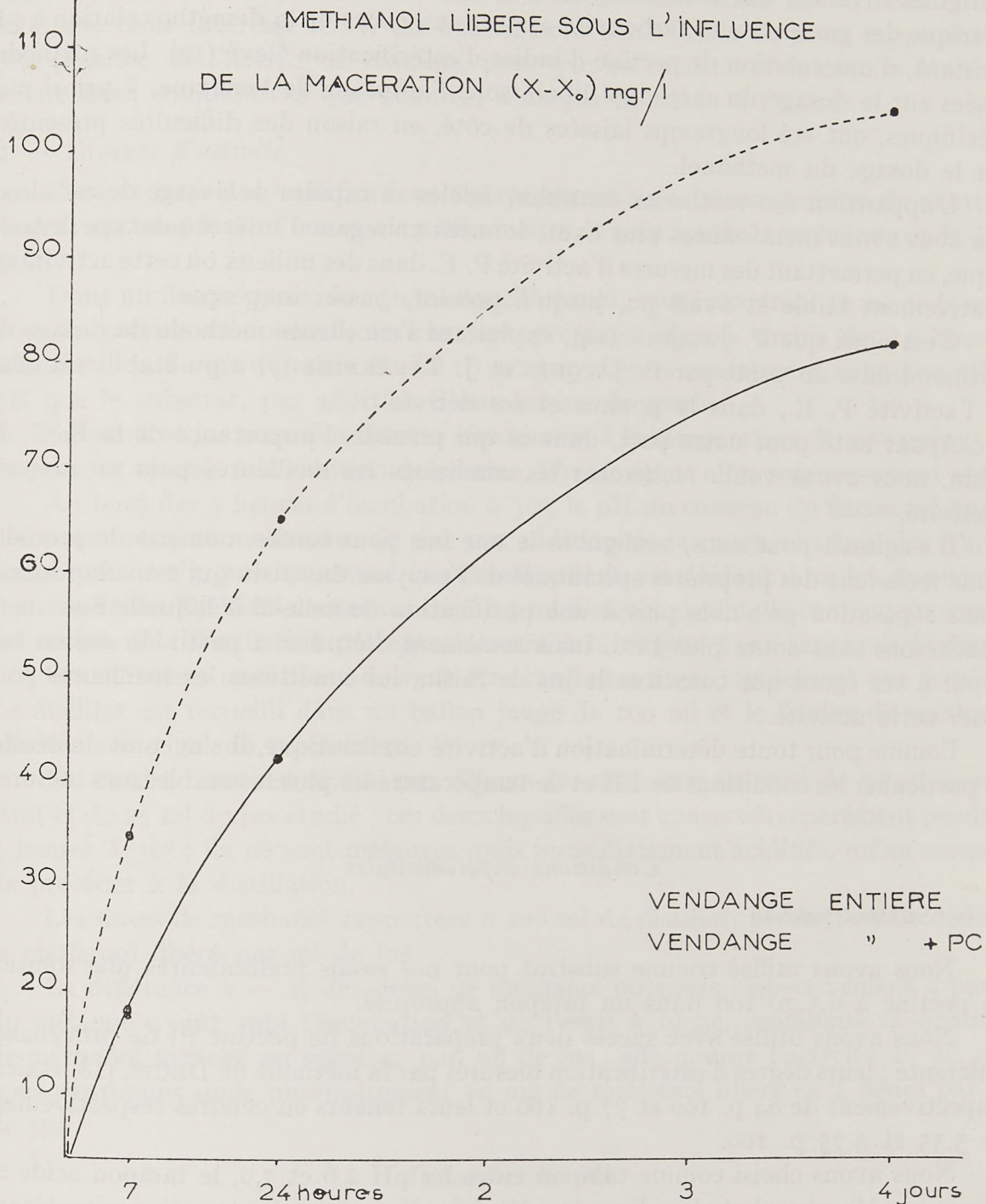
En fonction de ce que nous avons déjà vu, ce supplément de méthanol peut-être logiquement considéré comme lié aux taux de pectine solubilisé à partir de ciment pectocellulosique intercellulaire.

En première approximation et sous réserve de vérifications ultérieures nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il représente l'activité protopectinasique du milieu.

En tout état de cause, le produit P. c. accentue très notablement le phénomène

naturel surtout au cours des premières heures de macération ; il rend donc très vraisemblable l'existence dans P. c. d'une activité du type protopectinase qui expliquerait l'action favorisante de ce produit au cours de l'extraction du jus.

graphique 3



Soulignons que ce mélange P. c. ne fait qu'accentuer et rendre plus rapide, un phénomène naturel dont les effets peuvent être très marqués au bout de temps plus longs de macération.

III. — LA PECTINE-MÉTHYL-ESTÉrase DU RAISIN. MESURE D'ACTIVITÉ

La plupart des auteurs ayant accompli des travaux sur des pectines estérases d'origines diverses, ont utilisé des méthodes de mesure basées sur le dosage titrimétrique des groupements carboxyles apparus au cours de la déméthoxylation à pH constant, d'une solution de pectine d'indice d'estérification élevé (17). Les méthodes basées sur le dosage du méthanol libéré sous l'influence de l'enzyme, à priori plus spécifiques, ont été longtemps laissées de côté, en raison des difficultés présentées par le dosage du méthanol.

L'apparition des méthodes sensibles, fidèles et rapides de dosage de cet alcool que nous avons mentionnées plus haut, donnent un regain d'intérêt à ce type de technique, en permettant des mesures d'activité P. E. dans des milieux où cette activité est relativement faible et avait pu, jusqu'à présent, passer inaperçue.

C'est ainsi que P. JACQUIN (14), exploitant l'excellente méthode de dosage du méthanol mise au point par P. JACQUIN et J. TAVERNIER (7) a pu établir un bilan de l'activité P. E., dans la pomme et ses dérivés.

Ayant noté pour notre part, dans ce qui précède, l'importance de la P. E. du raisin, nous avons voulu rechercher les conditions les meilleures pour en mesurer l'activité.

Il s'agissait pour nous, soulignons-le une fois pour toutes, non pas de procéder à une recherche des propriétés spécifiques de l'enzyme du raisin qui est subordonnée à une séparation préalable puis à une purification de celle-ci à laquelle nous nous attacherons sans doute plus tard, mais seulement d'étudier à partir du milieu très impur à cet égard que constitue le jus de raisin, les conditions les meilleures pour doser cette activité.

Comme pour toute détermination d'activité enzymatique, il s'agissait de déceler en particulier les conditions de PH et de température les plus favorables aux mesures.

Conditions expérimentales

I. — Substrat utilisé

Nous avons utilisé comme substrat pour nos essais préliminaires une solution de pectine à 0,5 p. 100 dans un tampon approprié.

Nous avons utilisé avec succès deux préparations de pectine ⁽¹⁾ de provenance différente ; leurs degrés d'estérification mesurés par la méthode de DEUEL (18) étaient respectivement de 84 p. 100 et 77 p. 100 et leurs teneurs en cendres respectivement de 5,55 et 5,75 p. 100.

Nous avons choisi comme tampon entre les pH 2,6 et 7,0, le tampon acide citrique (0,1 M), phosphate bisodique (0,2 M). Afin d'empêcher toute action microbienne en cours d'incubation, le tampon était additionné de benzoate de soude (1,5 g/l), la même concentration en cet antiseptique étant maintenue dans les jus dont nous mesurions l'activité.

(1) Nous remercions la Société Unipeptine qui nous a fourni gracieusement l'un de ces échantillons.

De plus, afin de nous rapprocher des conditions de mesure imposées par l'une des définitions d'unité P. E. les plus souvent utilisées (17), le mélange mis en incubation contenait du chlorure de sodium à la concentration 0,15 M, la quantité correspondante de ClNa étant ajoutée, comme nous le verrons plus loin, soit à la solution tamponnée de pectine, soit au jus étudié. Nous avons déjà signalé plus haut, le rôle activateur particulier joué par les sels, en ce qui concerne l'activité P. E. des végétaux supérieurs ; dans un milieu dont la concentration saline est variable comme celui qui nous intéresse ici, il est évidemment souhaitable de nous rapprocher le plus possible, de l'activation maxima, pour que les conditions de mesure d'activité soient aussi comparables que possible, d'un jus de raisin à l'autre.

2. — *Mesure d'activité*

Compte tenu des modifications légères apportées à la composition du substrat, nous avons adopté pour nos essais préliminaires, le principe de la technique de P. JACQUIN :

Dans un flacon pyrex de 150 ml bouché émeri, sont introduits 50 ml de la solution de pectine tamponnée, fraîchement préparée (depuis moins de 24 heures). L'échantillon de jus de raisin étudié ⁽²⁾ est par ailleurs exactement ajusté au même pH que le substrat, par addition d'une lessive de soude.

Substrat et jus sont alors portés séparément à la température de 30°, puis 25 ml de jus sont ajoutés à la solution de pectine, l'heure étant alors soigneusement notée.

Au bout des 2 heures d'incubation à 30°, le pH du contenu du flacon est immédiatement ramené au-dessous de 3,0, par addition de la quantité nécessaire d'acide sulfurique au 1/3, puis transvasé quantitativement, en s'aidant d'un jet de pissette, dans un flacon Kjeldahl contenant déjà 2,5 ml d'alcool absolu ; le contenu du matras est soumis à la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (appareil Jaulmes).

Ces dernières opérations doivent être conduites aussi rapidement que possible. Le distillat est recueilli dans un ballon jaugé de 100 ml et le dosage du méthanol effectué sur 1 ml de ce distillat.

Un essai à blanc est réalisé par ailleurs sur une autre fraction de 50 ml de substrat et de 25 ml du jus étudié ; ces deux liquides sont conservés séparément pendant 2 heures à 30° ; ils ne sont mélangés, puis immédiatement acidifiés, qu'au moment de procéder à la distillation.

Les doses de méthanol rapportées à 100 ml de distillat, permettent de déduire le méthanol libéré par ml de jus.

La différence $x - x_0$ des doses de méthanol obtenues respectivement à partir du mélange ayant subi l'incubation et de l'essai à blanc, représente la quantité de méthanol arraché au substrat par ml de jus ; elle mesure l'activité P. E. que nous exprimons donc provisoirement en mg de méthanol libéré en 1 heure par ml de jus.

Influence du pH

Utilisant la technique précédente, nous avons recherché la zone de pH la plus favorable aux mesures d'activité. C'est dans tous les cas vers pH 5,6 que semble avoir lieu le maximum de libération du méthanol.

⁽²⁾ Conservé au moins 3 jours à la température ambiante, de façon à ce qu'il atteigne la limite de déméthoxylation de ses propres pectines.

Comme le montre le tableau 7, nous noterons cependant l'augmentation d'activité constatée vers la neutralité, dans l'un des jus considérés, conservé plusieurs mois avant la mesure. Sans une étude plus approfondie, il nous est pour l'instant impossible de formuler une hypothèse satisfaisante pour expliquer ce phénomène.

TABLEAU 7

Méthanol libéré (mg par ml de jus) à 30° C.

pH	Jus 1	Jus 2
2,6	0,005	
3	0,009	
3,5	0,014	
4	0,017	0,012
5	0,019	0,015
5,5		0,012
6	0,017	0,010
6,5	0,014	0,008
7	0,010	0,011

Influence de la température

Le tableau suivant (8) montre l'évolution de l'activité P. E. d'un jus de Carignan en fonction de la température ; les activités sont mesurées à pH 5,0.

TABLEAU 8

Température	Méthanol libéré (mg. par ml. de jus et par heure).
10°	0,006
20°	0,010
30°	0,017
40°	0,026
50°	0,018

Compte tenu des précédents résultats, nos mesures d'activités ont été faites par la suite dans les conditions les plus favorables c'est-à-dire à 40° et à pH 5,0.

Nous soulignons, que nous n'avions pas en vue ici, de préciser de façon définitive, ni la température optima ni le pH optimum d'action de la P. E. du raisin ; de telles déterminations ne pouvant se faire qu'à partir d'un matériel enzymatique préalablement purifié. Nous voulions seulement définir les conditions les meilleures pour mesurer l'activité P. E. dans le milieu impur que constitue le jus de raisin.

Il nous a paru cependant intéressant de voir, en opérant dans ces conditions, quelle était l'allure de la cinétique de libération du méthanol.

Essai. — Le substrat utilisé était de la pectine à 5 g/l mise en solution dans un tampon pH 5,0, additionné de benzoate de soude (1,5 g/l) et de chlorure de sodium.

La quantité nécessaire de ClNa pour obtenir la concentration finale (0, 15M) dans le mélange substrat + jus a été ajoutée dans ce cas, à la solution de pectine.

Le tableau 9 et la figure 4 montrent l'évolution de la réaction de désestérification

de la pectine en fonction du temps et à la température de 30°, respectivement pour un jus entier (1), pour un jus dilué 2 fois (2) et pour un jus dilué 3 fois (3), comme source enzymatique.

Pendant les premières heures de l'hydrolyse, la proportionnalité est assez satisfaisante entre les quantités de méthanol libéré et la quantité de P. E. réglée par la dilution.

Notons en passant, que la limite de déestérification atteinte au bout de 7 jours a été d'autant plus élevée que la dilution a été plus forte, c'est-à-dire que la quantité de P. E. mise en œuvre a été plus faible.

Compte tenu du degré d'estérification de la pectine utilisée, déterminé par dosage des groupements carboxylés libérés après saponification alcaline, 95 p. 100 du méthanol fixé sur la pectine a été libéré par le jus dilué 3 fois, alors que 92 p. 100 ont été libérés par le moût dilué 2 fois, et 86 p. 100 seulement par le moût entier.

TABLEAU 9

Méthanol (mg) libéré par ml de jus.

Durée de l'hydrolyse	1 h. 30	4 h. 30	7 h. 30	23 h.	72 h.	7 jours
Jus entier 1	0,030	0,094	0,186	0,594	0,768	0,746
Jus dilué 2 fois 2	0,016	0,046	0,09	0,404	0,716	0,792
Jus dilué 3 fois 3	0,010	0,034	0,065	0,283	0,664	0,824
Hydrolyse à 30° pH 5,0						

Nous noterons aussi sur la figure (4), l'allure assez étonnante des courbes, qui traduisent, dans les premières heures de l'hydrolyse, une accélération de la vitesse de cette dernière.

Nous avons émis l'hypothèse que l'activation provoquée par le chlorure de sodium, pouvait fort bien ne pas se manifester instantanément et par conséquent nécessiter une incubation préalable de l'enzyme du moût, en présence du chlorure de sodium.

Le tableau 10 montre l'influence de cette incubation préalable en fonction de la durée de l'incubation, dans le cas d'un jus de Carignan.

TABLEAU 10

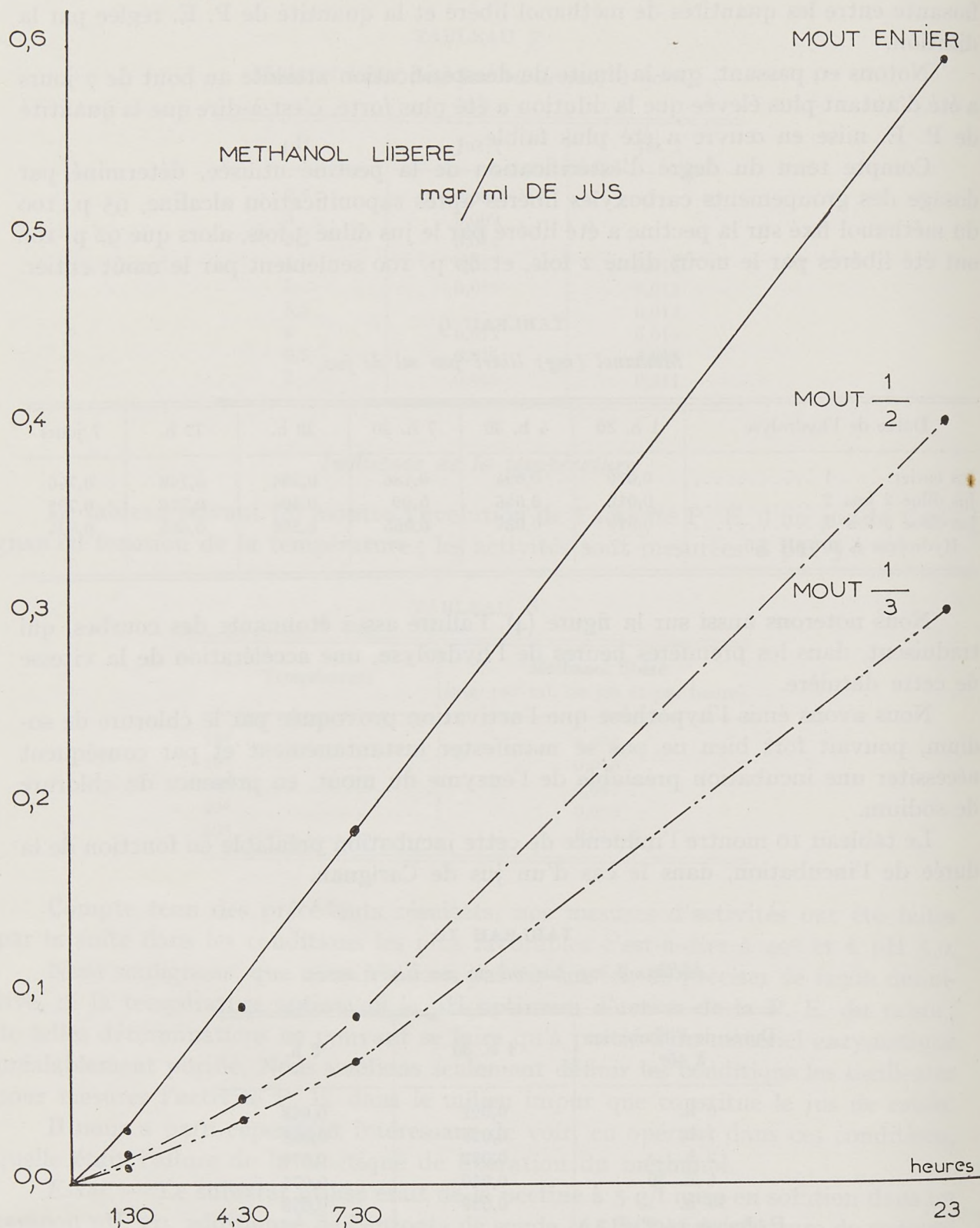
Méthanol mg par ml de jus libéré après.

Durée de l'incubation à 40°	1 h. 30	3 h.
0 h.	0,022	0,048
1 h.	0,028	0,058
2 h.	0,032	0,070
4 h. 30	0,040	0,074
13 h.	0,038	0,058
Hydrolyse à 40° pH 5,0		

Jusqu'à 4 h. 30 d'incubation, l'activation semble croître avec la durée de celle-ci en début d'hydrolyse mais s'accompagne déjà d'un affaiblissement de l'activité au

bout de 3 heures d'hydrolyse, ce phénomène [étant encore plus accentué lorsque l'incubation dure 13 heures.

graphique 4



Nous avons pensé que dans ces conditions, une durée d'incubation de 3 heures était correcte.

Nous ne voulons tirer aucune conclusion définitive de ces données expérimentales qui sembleraient à priori contredire l'hypothèse selon laquelle le ClNa ou plus généralement les cations n'interviendraient que pour bloquer en cours de désestérification le mécanisme inhibiteur dû à la formation d'un complexe inactif enzyme-groupements carboxyles libres (19). Un tel mécanisme peut fort bien intervenir dans notre cas et l'activation maxima être obtenue de ce point de vue même sans addition de chlorure de sodium étant donné de toutes façons la richesse de notre milieu en cations (ceux du jus + ceux du tampon).

Il est plus vraisemblable d'envisager ce phénomène comme lié à l'impureté de notre matériel enzymatique ou à l'état de sa structure colloïdale au moment du dosage.

Si au cours d'un autre essai, dont nous ne reproduirons pas ici les résultats pour ne pas surcharger notre exposé, le même phénomène a pu être observé, dans un troisième essai par contre, réalisé avec un moût conservé longtemps au frigo, l'incubation pendant 3 heures à 40° n'a eu aucun effet ni favorable ni défavorable.

Sans perdre de vue le but que nous poursuivons, qui est de rechercher une méthode de détermination de l'activité P. E. du raisin, valable dans la majorité des cas, il est logique d'effectuer une incubation préalable du moût à 40°, pendant 3 heures, en présence de la quantité de ClNa nécessaire pour que la concentration finale lors de l'essai proprement dit soit 0,15 M.

Nos résultats semblent en effet montrer qu'un tel protocole ne conduit pas à une perte d'activité et que par contre, dans certains cas, il assure pratiquement une activation maxima.

En fonction de l'ensemble des données précédentes, voici donc le protocole que nous proposons pour la mesure de la pectine méthyl-estérase du jus de raisin.

Préparation du substrat. — 5 g de pectine de degré d'estérification élevé (75 à 85 p. 100) sont mis en solution ⁽¹⁾ dans un litre de solution tampon pH 5,0 de composition suivante :

— Phosphate bisodique 0,2 M : 514 ml.

— Acide citrique 0,1 M : 486 ml.

On ajoute également par litre de solution, 1,5 g de benzoate de soude.

Préparation du jus. — Le volume nécessaire du jus de raisin étudié est ajusté à pH 5,0 par une quantité connue de lessive de soude ; on dissout dans celui-ci après l'avoir porté à 40°, 2,63 g de ClNa dans 100 ml (quantité nécessaire pour que le mélange final, substrat + jus, soit à la concentration 0,15 M).

Hydrolyse. — Au bout de 3 heures, 25 ml du jus incubé, sont ajoutés dans un flacon pyrex hermétiquement bouché, à 50 ml de substrat préalablement porté à 40° ; le temps est alors soigneusement noté.

Le reste de la mesure se poursuit comme il est décrit plus haut.

Unités de mesure. — Nous exprimons comme P. JACQUIN l'activité P. E. par la quantité de méthanol libérée par heure et par ml de jus ;

Aux erreurs de dosage près qui peuvent revêtir une certaine importance surtout pour les durées d'hydrolyse très faibles, il semble bien que dans les conditions où nous opérons, la quantité de méthanol libéré soit une fonction linéaire du temps.

(1) Pour effectuer cette dissolution faire tomber la pectine en pluie et très lentement dans le solvant porté vers 40-45°, en maintenant une agitation importante à l'aide d'un agitateur mécanique.

Nous pouvons donc pour les déterminations approximatives nous limiter à une seule mesure pour un temps d'hydrolyse suffisamment long, par exemple 3 heures.

Il est préférable, pour des déterminations plus précises, de choisir des temps d'hydrolyse variables et de définir l'activité P. E. par la pente moyenne de la courbe de libération du méthanol en fonction du temps ou si l'on préfère, par la moyenne des activités (mg de méthanol libéré par heure) déterminées pour les différents temps d'hydrolyse.

Le tableau II et la figure (5) donnent un exemple d'application de cette dernière méthode à un jus de Carignan entier et au même jus dilué 2 et 3 fois.

TABLEAU II

Méthanol libéré mg/ml de jus.

Temps d'hydrolyse	Moût entier		Moût 1/2		Moût 1/3	
	Total	par Heure	Total	par Heure	Total	par Heure
1 h. 30	0,036	0,024			0,014	0,093
3 h.	0,064	0,021	0,038	0,012	0,027	0,090
4 h. 30	0,102	0,023	0,056	0,012	0,038	0,084
6 h.	0,134	0,022	0,074	0,012	0,050	0,083
moyenne		0,0225		0,012		0,087

Hydrolyse à 40° - pH 5,0

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Il convient de situer ce travail dans le cadre plus général d'une étude des divers phénomènes intervenant au cours de l'extraction du jus ou dans les premières heures qui suivent l'extraction de celui-ci.

Notre point de départ a été fourni par l'expérimentation d'une préparation commerciale d'enzymes pectiques, réalisée principalement du point de vue de l'augmentation des rendements en jus par addition de ce produit à la vendange foulée.

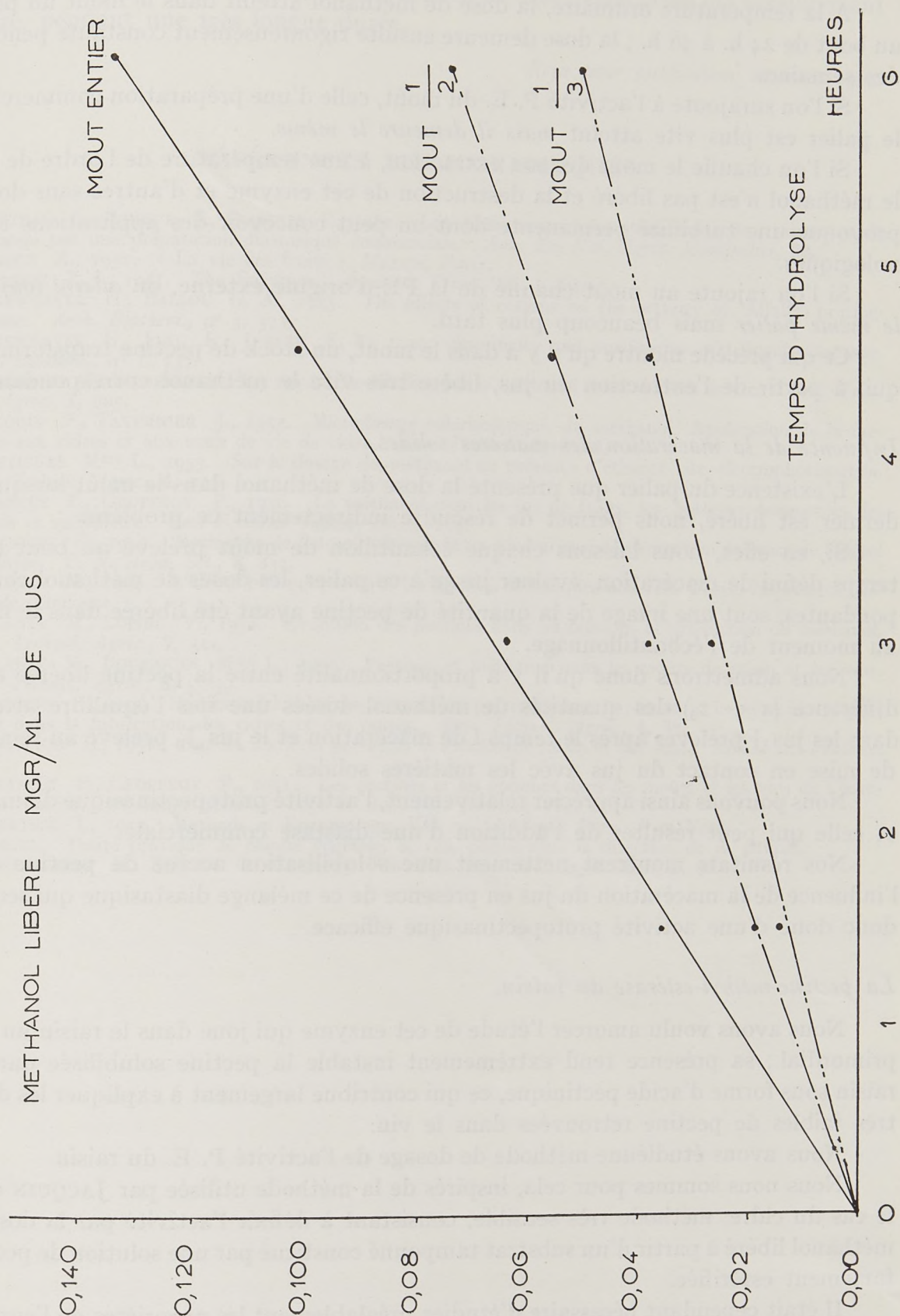
Nous avons obtenu de la sorte une augmentation nette, parfois très importante, des rendements en jus doublée d'une facilité d'extraction nettement accrue (voir Annales de l'E. N. A. M. Vol. 30. Fasc. 3 et 4).

Par quel mécanisme cette amélioration des conditions d'extraction est-elle acquise ?

Les diastases pectolytiques agissent-elle en diminuant la viscosité du jus par une action pectine-méthyl-estérasique (P. E.) et polygalacturonique (P. G.), ou bien sont-elles douées d'une activité protopectinasique agissant sur les parois cellulaires pour les dégrader et faciliter ainsi l'extraction du jus ?

A première vue, l'activité P. E. semblait jouer un rôle très important, car au cours de l'étude citée plus haut, tous les échantillons de vendange traités ayant fourni un rendement accru en jus, ont également fourni des doses de méthanol supérieures à celles des témoins de vendange non traités.

GRAPHIQUE 5



Cinétique de la libération du méthanol dans le jus isolé.

A la température ordinaire, la dose de méthanol atteint dans le moût un palier au bout de 24 h. à 48 h. ; la dose demeure ensuite rigoureusement constante pendant des semaines.

Si l'on surajoute à l'activité P. E. du moût, celle d'une préparation commerciale, le palier est plus vite atteint *mais il demeure le même*.

Si l'on chauffe le moût dès son extraction, à une température de l'ordre de 80°, le méthanol n'est pas libéré et la destruction de cet enzyme et d'autres sans doute, provoque une turbidité permanente dont on peut concevoir des applications technologiques.

Si l'on rajoute au moût chauffé de la PE d'origine externe, on *atteint toujours le même palier* mais beaucoup plus tard.

Ce qui précède montre qu'il y a dans le moût, un stock de pectine transformable qui, à partir de l'extraction du jus, libère très vite le méthanol correspondant.

Influence de la macération des matières solides.

L'existence du palier que présente la dose de méthanol dans le moût lorsque ce dernier est libéré, nous permet de résoudre indirectement ce problème :

Si, en effet, nous laissons chaque échantillon de moût prélevé au bout d'un temps défini de macération, évoluer jusqu'à ce palier, les doses de méthanol correspondantes, sont une image de la quantité de pectine ayant été libérée dans le moût au moment de l'échantillonnage.

Nous admettrons donc qu'il y a proportionnalité entre la pectine libérée et la différence $(x - x_0)$ des quantités de méthanol dosées une fois l'équilibre atteint, dans les jus J prélevés après le temps t de macération et le jus J_0 prélevé au temps 0 de mise en contact du jus avec les matières solides.

Nous pouvons ainsi apprécier relativement, l'activité protopectinasique du milieu et celle qui peut résulter de l'addition d'une diastase commerciale.

Nos résultats montrent nettement une solubilisation accrue de pectine sous l'influence de la macération du jus en présence de ce mélange diastasique qui semble donc doué d'une activité protopectinasique efficace.

La pectine-méthyl-estérase du raisin.

Nous avons voulu amorcer l'étude de cet enzyme qui joue dans le raisin un rôle primordial ; sa présence rend extrêmement instable la pectine solubilisée dans le raisin sous forme d'acide pectinique, ce qui contribue largement à expliquer les doses très faibles de pectine retrouvées dans le vin.

Nous avons étudié une méthode de dosage de l'activité P. E. du raisin

Nous nous sommes pour cela, inspirés de la méthode utilisée par JACQUIN dans le cas du cidre, méthode très sensible, consistant à définir l'activité par la dose de méthanol libéré à partir d'un substrat tamponné constitué par une solution de pectine fortement estérifiée.

Il était cependant nécessaire d'étudier préalablement les propriétés de l'enzyme du raisin et particulièrement sa température et son pH optimum d'action.

Le pH optimum se situe aux environs de 5,0 ; il est plus bas que celui généralement signalé pour les P. E. des végétaux supérieurs.

La température optima est de l'ordre de 40°.

Dans ces conditions de mesure, la réaction de désestérification est sensiblement linéaire, pendant une très longue durée.

Reçu pour publication en mars 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) MARTEAU G., SCHEUR J., OLIVIERI C., 1960. Les diastases pectolytiques. Essai de traitement de vendange par une préparation diastasique commerciale. *Ann. Éc. Nat. Agric. Montpellier*, **30**,
- (2) ULRICH R., 1952. « La vie des fruits ». *Masson, Paris*.
- (3) KERTESZ Z. I., 1951. The Enzymes. *Academic Press*, Vol. I, Part. 2.
- (4) LINEWEAYER H., BALLOU G. A., 1945. The effects of cations on the activity of Alfalfa pectine-estérase. *Arch. Biochem.*, n° 3, 373.
- (5) LINEWEAVER H., JANG R., JANSEN E. F., 1949. Specificity and purification of polygalacturonase. *Arch. Biochem.*, n° 1, 137.
- (6) BERTRAND G., SILBERSTEIN L., 1952. Recherches sur le méthanol contenu dans le vin. *Ann. Technol. Agric.*, **1**, 205.
- (7) JACQUIN P., TAVERNIER J., 1953. Microdosage colorimétrique du méthanol. Application de la méthode aux cidres et aux eaux de vie de cidre. *Ann. Technol. Agric.*, **2**, 113.
- (8) BOUZIGUES M^{me} L., 1955. Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol par électrophotométrie. *Ann. Technol. Agric.*, **4**, 223.
- (9) FRANCOT P., GEOFFROY P., 1956. Le méthanol dans les jus de fruits, les boissons fermentées, les alcools et spiritueux. *Rev. Ferment. Indust. Alim.*, 279.
- (10) DENIGES G., 1910. Recherche de l'alcool méthylique en général et spécialement en présence de l'alcool éthylique. *C. R. Acad. Sci.*, **3**, 832.
- (11) FLANZY M., 1934. L'alcool méthylique dans les liquides alcooliques naturels. Thèse. Imprimerie Régionale, Toulouse.
- (12) FLANZY M., LOISEL Y., 1958. Évolution des pectines dans les boissons et production du méthanol. *Ann. Technol. Agric.*, **7**, 311.
- (13) FLANZY M., BOUZIGUES M^{me} L., 1959. Pectines et méthanol dans les moûts de raisin et les vins. *Ann. Technol. Agric.*, **8**, 55-59.
- (14) JACQUIN P., 1955. Pectine méthylestérase et matières pectiques dans la pomme et la poire, leur importance dans la fabrication des cidres et des poirés. *Ann. Technol. Agric.*, **4**, 67.
- (15) PEYNAUD E., 1952. Sur les matières pectiques des moûts de raisin et des vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **1**, II.
- (16) FRANCOT P., GEOFFROY P., 1951. Les pectines et les gommes dans les moûts et les vins de Champagne. Comm. IV^e Congr. Athènes 1950 et *Bull. Off. Internat. Vin*, 242.
- (17) KERTESZ I., 1955. Methods in Enzymology. Vol. 2. *Academic Press, New York*.
- (18) DEUEL. Traité pratique de chimie végétale, **3**, 186, publié sous la direction de A. Brunel.
- (19) LINEWEAVER H., BALLOU G. A., 1943. *Proc. Fed. Am. Soc. Exptl. Biol.*, **2**, 66.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 24-8-1961.

Dépôt légal : 3^e trimestre 1961

N° d'impression : 861

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ LA LEVURE (Suite)

Huguette de ROBICHON-SZULMAJSTER

Laboratoire d'Enzymologie, Centre national de la Recherche scientifique, Gif-sur-Yvette (S. et O.)

V. — CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE

Au cours de ce chapitre, le rôle des différents gènes connus qui contrôlent le métabolisme du galactose, sera examiné.

L'introduction donnera un aperçu des connaissances précédemment acquises concernant la génétique du métabolisme du galactose chez les levures. Les rôles respectivement attribués à chacun des trois gènes actuellement identifiés, seront exposés brièvement.

La partie expérimentale sera consacrée à l'examen du rôle de deux de ces gènes G_1 et G_2 . Il sera montré que le gène G_1 contrôle la biosynthèse de la galactokinase, tandis que le gène G_2 contrôle la biosynthèse d'un système que j'ai appelé « galactose-perméase ».

Quelques propriétés de la galactose-perméase de la levure (qui n'avait jamais été mise en évidence auparavant) seront examinées.

Il sera montré que la souche CH-1, diploïde, génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$, « galactose positive », incorpore le galactose, non seulement à l'état de sucre libre, mais le transforme en une forme de réserve, probablement le tréhalose.

Le rôle des gènes G_1 et G_2 sera examiné. De plus, il sera fait quelques remarques concernant l'importance physiologique de la galactose-perméase, le rôle possible des perméases dans le phénomène d'attaque préférentielle ainsi que le rôle que l'on peut attribuer à l'incorporation des sucres libres dans un « pool » de tréhalose intracellulaire.

Le contrôle génétique des autres réactions métaboliques du galactose, mis en évidence chez d'autres organismes, sera résumé très brièvement.

5.1 INTRODUCTION

Capacité de fermenter le galactose :

Le caractère « Capacité/Incapacité » de fermenter le galactose est bien connu chez les levures. Il a été couramment utilisé, de même que la capacité de fermenter d'autres hydrates de carbone, pour la classification de ces microorganismes.

Des deux espèces dont il est question dans le présent travail, *S. fragilis* est « galactose-positif », c'est-à-dire capable de fermenter le galactose dans les conditions habituelles de ce test ⁽¹⁾.

Le même test, appliqué à *S. cerevisiae*, conduit, selon les clones d'origine sauvage étudiés, à des réponses beaucoup plus variables. C'est ainsi que LODDER (1952) donne pour *S. cerevisiae* les caractéristiques fermentatives suivantes : Glucose (+), Maltose (+), Galactose (+), mais parfois faible ou (—), Lactose (—).

Ségrégation des caractères concernant le métabolisme des sucres :

Grâce à la méthode d'isolement des cellules et de dissection des asques à l'aide du micromanipulateur (WINGE et LAUSTEN, 1937) et à l'obtention d'hybrides par appariement de deux spores sexuellement compatibles (WINGE et LAUSTEN, 1938), WINGE et LAUSTEN, (1939) avaient clairement montré :

1) que toutes les cellules d'un clone issu d'une spore unique se comportent comme la cellule-mère en ce qui concerne leurs capacités fermentatives ;

2) que les hybrides interspécifiques, Raffinose (+) × Raffinose (—), Mélibiose (+) × Mélibiose (—), Sucrose (+) × Sucrose (—), sont tous positifs. La capacité de fermenter le glucide est donc un caractère dominant ;

3) qu'une ségrégation mendélienne simple, 2 : 2, pour chacun des caractères étudiés pouvait être démontrée par l'analyse des spores isolées individuellement à partir d'asques à quatre spores.

Mise en évidence de l'existence d'un gène concernant le caractère « slow » :

La possibilité de généraliser ce déterminisme héréditaire classique à l'ensemble des caractères contrôlant la fermentation des sucres chez les levures sembla remise en question lorsque LINDEGREN et coll. obtinrent des ségrégations irrégulières (ségrégations 3(+) : 1(—), et 4(+) : 0(—), à partir d'hybrides supposés différer par un seul gène ; LINDEGREN, 1946), à partir de croisements interspécifiques faisant intervenir les caractères « Fermentation du mélibiose » et « Fermentation du galactose » (LINDEGREN, SPIEGELMAN et LINDEGREN, 1944 ; LINDEGREN, 1945 ; SPIEGELMAN, LINDEGREN et LINDEGREN, 1945).

Afin d'expliquer ces résultats inattendus, obtenus surtout lorsque la sporulation avait lieu en présence de galactose, LINDEGREN et LINDEGREN (1946) proposèrent une théorie selon laquelle un facteur cytoplasmique auto-reproductible serait

(1) Une souche est dite « positive » lorsqu'on peut observer un dégagement de CO₂ pendant les trois premiers jours de contact anaérobie avec ce sucre, au sein d'un milieu nutritif. Une souche sera « négative » si aucun dégagement de CO₂ ne se produit, quelle que soit la durée du contact. Il existe, d'autre part, des souches de type intermédiaire, ne produisant un dégagement qu'après une période de l'ordre d'une semaine et parfois même plus longue : ce dernier type est dit « slow ».

Les conditions de ce test permettent à la fois l'adaptation enzymatique, la croissance et éventuellement la sélection des mutants.

l'entité responsable de la synthèse de l'enzyme. Ce facteur serait doué d'une autonomie suffisante pour se maintenir pendant un certain nombre de générations en l'absence de l'allèle dominant initiateur de sa formation, à condition de se trouver continuellement en présence de l'inducteur.

WINGE et ROBERTS (1948) montrèrent que la plupart des ségrégations aberrantes observées par LINDEGREN pouvaient être expliquées par les données de la génétique classique. Au cours de leur étude systématique des conditions requises pour la manifestation du phénotype « slow » ils montrèrent que la différence entre le type « slow » et le type « sauvage » est sous le contrôle d'un gène, mais qu'elle est de nature quantitative : l'allèle G (présent chez *S. cerevisiae*) provoque la fermentation du galactose dans un délai court (1 à 3 jours), tandis que l'allèle gs (présent chez *S. chevalieri*) requiert une période d'adaptation de l'ordre d'une semaine.

Lorsque l'adaptation a eu lieu les deux souches fermentent le galactose à une vitesse identique. Il ne s'agit donc pas d'une différence dans la quantité de « galactozymase » formée, mais dans la vitesse de formation de ce système enzymatique. SPIEGELMAN et de LORENZO (1952) arrivèrent aux mêmes conclusions.

SPIEGELMAN (1951) avait, par ailleurs, réfuté la suggestion de LINDEGREN (1949) et MUNKUR et LINDEGREN (1949) selon laquelle l'apparition de colonies de type « slow » pouvait être due à un processus de mutation suivi de sélection, à partir de cellules de génotypes « négatif », et montré qu'il s'agit d'un phénomène réversible, intéressant toutes les cellules de la population.

L'étude de la transmission, en absence de galactose, du caractère « slow » aux bourgeons issus d'une cellule isolée (SPIEGELMAN, de LORENZO et CAMPBELL, 1951) conduisit ces auteurs à formuler l'hypothèse suivante : en l'absence du gène responsable de leur biosynthèse, des particules hypothétiques, jouant le rôle de modèle, se trouveraient diluées par chaque génération cellulaire ⁽¹⁾. La présence d'une seule particule par cellule serait toutefois capable d'assurer la formation d'une colonie « positive » (voir aussi, CAMPBELL et SPIEGELMAN, 1956).

Il est remarquable, comme le constatent WINGE et ROBERTS (1958) que seul le petit nombre de particules qui ont été postulées (de l'ordre de cent) conduit à éliminer la possibilité que l'enzyme elle-même puisse être l'élément cytoplasmique en question. Il suffirait d'admettre, qu'au lieu d'une particule unique il faut, pour assurer un phénotype (+) à une cellule de génotype « slow », un nombre minimum de molécules d'enzyme qui pourrait en ce cas être élevé — par exemple dix mille — pour que cette contradiction fût levée.

Mise en évidence de l'existence de plusieurs gènes complémentaires contrôlant le métabolisme du galactose :

En dehors des expériences qui ont été résumées précédemment, LINDEGREN et LINDEGREN (1947) mirent en évidence une ségrégation mendélienne simple pour un couple de caractères « capacité/incapacité » de fermenter le galactose. La manifestation phénotypique de ce gène (nettement négative lorsque ce gène est à l'état récessif) semble indiquer qu'il s'agit d'un gène distinct de celui déterminant le caractère « slow ».

ROMAN et coll. (1951) observèrent de même une ségrégation 2 : 2 pour un caractère concernant également la fermentation du galactose.

⁽¹⁾ Cette conception est dérivée de l'hypothèse dite du « cytogène » formulée par LINDEGREN et LINDEGREN (1946).

Des expériences préliminaires de HAWTHORNE avaient indiqué que les gènes étudiés par LINDEGREN et LINDEGREN (1947) et celui étudié par ROMAN et coll. (1951) n'étaient probablement pas alléliques.

D'autre part, LEUPOLD et HOTTINGER (1954), étudiant la ségrégation de différents caractères chez *S. cerevisiae*, obtinrent une ségrégation caractéristique de l'intervention de deux gènes complémentaires pour le caractère « fermentation du galactose », présent dans leur stock. L'une des souches qui fut utilisée pour le croisement étant « galactose-positive », il fut supposé que l'autre partenaire (BI5) était un double récessif.

DOUGLAS et CONDIE (1954) entreprirent une caractérisation préliminaire du rôle de chacun des deux gènes impliqués.

Des mutants haploïdes, provenant du stock de LINDEGREN (286 et 1426A) furent employés par ces auteurs. L'un d'eux fut trouvé complètement incapable de fermenter le galactose, et fut appelé g_1g_2 , tandis que l'autre, apparemment « négatif » lorsqu'il est essayé avec des concentrations en galactose inférieures à 0,5 p. 100, est cependant capable de fermenter le galactose à des concentrations supérieures

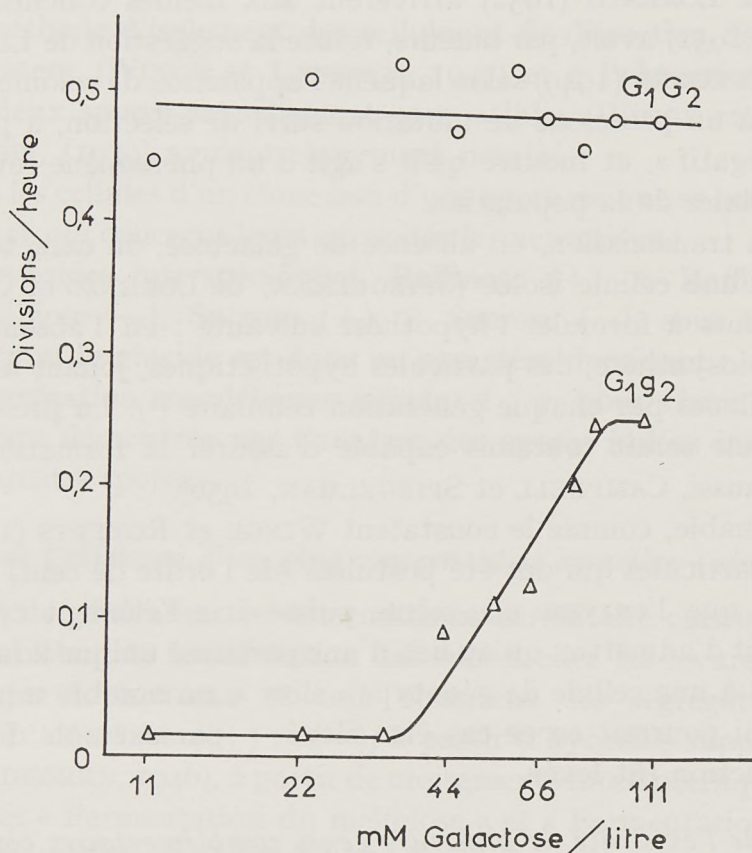


FIG. 24. — Croissance des souches de différents géotypes aux dépens du galactose.
D'après DOUGLAS et CONDIE, 1954.

à 2 p. 100 (voir figure 24). On attribue à cette souche géotype G_1g_2 . Le diploïde hétérozygote résultant du croisement de ces deux souches fermente le galactose aussi rapidement qu'une souche de type « sauvage ». Les asques sont de type : 0 : 4, 1 : 3, et 2 : 2 (positif : négatif), avec les fréquences attendues pour la ségrégation de deux gènes indépendants.

Étant donné l'incapacité totale de fermenter le galactose, manifestée par la souche de géotype g_1g_2 , il fut admis que l'allèle g_1 pouvait être responsable d'une déficience d'ordre métabolique, intéressant l'une des enzymes de la transformation du galactose.

D'autre part, DOUGLAS et CONDIE purent montrer que les extraits de souches portant l'allèle récessif g_2 — à condition d'avoir été cultivées préalablement sur une concentration suffisante de galactose — formaient à partir de ce substrat, la même quantité d'esters phosphorylés que les extraits de cellules de génotype « sauvage » dans les mêmes conditions. Il fut donc supposé que le gène G_2 contrôle un mécanisme assurant la perméabilité des cellules envers le galactose.

Complémentarité. — Allélisme :

Afin d'être à même de coordonner les résultats de ces différents auteurs, HAWTHORNE entreprit le travail de clarification génétique qui s'imposait. Il montra (HAWTHORNE, 1956) que les trois gènes (G_1 - G_2 - G_3) sont complémentaires, la présence des trois allèles dominants étant nécessaire pour assurer une fermentation rapide du galactose.

Les tests d'allélisme permirent d'identifier les gènes impliqués dans les travaux précédemment cités. Il est apparu que les gènes G_1 et G_2 , étudiés par DOUGLAS et CONDIE (1954) sont également ceux présents dans le double récessif de LEUPOLD et HOTTINGER (1954). Par ailleurs, le gène présent dans le matériel de WINGE et ROBERTS (1948) et dénommé par ces auteurs g_s a été trouvé allélique avec le caractère « slow » étudié par LINDEGREN et ses collaborateurs (*cf.* LINDEGREN, SPIEGELMAN et LINDEGREN, 1944 ; LINDEGREN, 1945 ; SPIEGELMAN, LINDEGREN et LINDEGREN, 1945). Par analogie de nomenclature, HAWTHORNE nomma ce gène G_3 .

Il ressort du travail de HAWTHORNE que l'on connaît, par conséquent, à l'heure actuelle, trois gènes intéressant l'utilisation et la transformation du galactose par les levures.

Avant d'aborder la partie expérimentale, je rappellerai les rôles respectivement attribués à ces trois gènes :

G_1 — est supposé contrôler une réaction faisant partie du métabolisme du galactose.

G_2 — est supposé contrôler un mécanisme modifiant la perméabilité cellulaire envers le galactose.

G_3 — est supposé contrôler la vitesse (et peut-être le processus) de l'induction de la capacité de fermenter le galactose.

Seuls les caractères contrôlés par les deux premiers de ces gènes ont été particulièrement étudiés au cours du présent travail. Les génotypes des souches utilisées pour cette étude ont été déterminés par D. C. HAWTHORNE comme étant les suivants :

N° de la souche	État	Génotype	Phénotype
1 235/2b	Haploïde	$g_1G_2G_3$	Incapable de fermenter le galactose après adaptation à ce sucre.
1 238/5d	Haploïde	$G_1g_2G_3$	Capable de fermenter le galactose (après adaptation) seulement aux concentrations élevées de ce sucre.
1 213/4c	Haploïde	$G_1G_2g_3$	Capable de fermenter le galactose seulement après adaptation prolongée à ce substrat.
B 15	Haploïde	$g_1g_2G_3$	Incapable de fermenter le galactose après adaptation à ce sucre.
CH-1	Diploïde	$g_1G_2G_3$ $G_1g_2G_3$	Capable de fermenter et d'utiliser le galactose pour la croissance après quelques heures d'adaptation à ce sucre.

L'étude de ce matériel a permis de vérifier entièrement les hypothèses de départ. Il sera en effet montré que le gène G_1 contrôle la synthèse d'une enzyme du métabolisme du galactose, la galactokinase, tandis que le gène G_2 contrôle un système de nature enzymatique qui sera appelé « Galactose-perméase ».

5.2 DÉTERMINATION DU RÔLE DU GÈNE G_1

Caractérisation des enzymes par incorporation du ^{14}C -galactose dans les nucléotides uridyliques :

Afin de déterminer le rôle du gène G_1 , une première expérience a été effectuée qui consiste à comparer l'incorporation du galactose radioactif dans les nucléotides, catalysée par des extraits dialysés provenant, soit d'une souche « galactose-positive » de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ (CH-1), soit d'une souche de génotype $g_1G_2G_3$ (1235/2b).

Un contrôle préliminaire est effectué, consistant à mesurer l'activité du système complet additionné des différents extraits supposés déficients, afin de vérifier qu'il ne s'agit pas de la présence d'un inhibiteur dans ces extraits.

Les résultats de cette expérience, effectuée selon la technique décrite dans 3.10, sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II

Incorporation du ^{14}C -galactose dans la fraction nucléotidique (UDPGal et UDPG)

Activités comparées des souches de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ et $g_1G_2G_3$, induites.

Mélange d'incubation :

^{14}C -galactose (225 000 cpm/ μmole)	0,5 μ mole
^{12}C -galactose	0,5 μ mole
ATP	1,7 μ moles
MgCl_2	5,0 μ moles
UDPG	0,4 μ mole
FNa	25,0 μ moles
Cystéine neutralisée	10,0 μ moles
Extraits : selon les indications	
Tampon : Tris, pH 7,5, concentration finale 0,1 M	
Eau distillée : complément à 1 ml.	

Incubation : à 37°, arrêtée par ébullition pendant 2 minutes.

Adsorption des nucléotides : sur Norite (voir Techniques).

Radioactivité : mesurée sur une fraction aliquote de l'éluat.

Extraits (200 μl)	Galactokinase ajoutée (100 μl)	Gal-1-P/G-1-P uridytransf. ajoutée (30 μl)	m μmoles Galactose incorp./h et par mg prot.
$g_1G_3G_2/G_1g_2G_3$ (CH-1)			
16,5 mg prot./ml +	—	—	284
» +	+	—	272
» +	—	+	272
» (inact. à 100°, 2 min) +	—	+	< 1
$g_1G_2G_3$ (1 235/2b)			
5 mg prot./ml +	—	—	< 1
» +	+	—	370
» +	—	+	< 1
» (inact. à 100°, 2 min) +	—	+	< 1

Pour que les extraits additionnés du système complet (^{14}C -galactose, ATP, Mg^{++} , UDPG, etc.) forment des nucléotides (UDPGal et UDPG) radioactifs, ils doivent

contenir au moins les deux premières enzymes du système : galactokinase et Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase. L'absence d'incorporation peut donc être due à l'absence de l'une ou de l'autre de ces enzymes (ou des deux à la fois).

Afin de permettre l'identification de l'enzyme absente, chaque extrait est également testé en présence de galactokinase ou de Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase ajoutées.

On voit, dans le tableau 11, que les extraits provenant de la souche CH-1 incorporent le galactose dans la fraction nucléotidique et que l'addition de l'une ou de l'autre des deux enzymes complémentaires n'augmente pas cette incorporation.

Au contraire, les extraits provenant de la souche 1235/2b n'incorporent qu'en présence de galactokinase ajoutée. Il peut donc être conclu d'une telle expérience que ces extraits possèdent la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, mais sont dépourvus de galactokinase.

Caractérisation spectrophotométrique des enzymes du métabolisme du galactose chez plusieurs souches de géotypes différents :

Une détermination quantitative spécifique de la Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase, de l'UDPGal-4-épimérase, ainsi que de la G-1-P/PP uridyltransférase, a été effectuée. Afin d'obtenir, dans une même expérience, une image complète, les 4 souches (représentant 4 géotypes différents) ont été analysées comparativement, après culture sur glucose ou sur galactose.

Les résultats concernant le caractère adaptatif de ces enzymes seront examinés dans le chapitre suivant. Il sera retenu ici (voir tableau 12) que la galactokinase est totalement absente des extraits des souches portant l'allèle récessif g_1 , ce que confirme l'expérience précédente. Ces souches possèdent, par contre, des activités comparables à celles de CH-1 pour les deux autres enzymes, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et UDPGal-4-épimérase.

Ces déterminations ont été effectuées soit sur des cellules cultivées en présence de glucose, « non-induites », soit en présence de galactose, « induites ». L'induction est effectuée par culture sur acétate + galactose ou par culture sur glucose, puis incubation avec le galactose (voir chapitre 6).

Les déterminations spectrophotométriques permettent, dans les conditions employées, de détecter la transformation de 10^{-5} μ mole de substrat par minute.

On voit donc que la quantité maximum de galactokinase qui pourrait être présente dans les extraits de 1235/2b est inférieure à 0,1 p. 100 de la quantité présente dans CH-1. La déficience en galactokinase, due à la présence de l'allèle g_1 est donc très prononcée, sinon totale.

5.3. DÉTERMINATION DU RÔLE DU GÈNE G_2

Il ressort des résultats présentés dans le tableau 12 que la souche 1238/5d de géotype $G_1g_2G_3$ possède, après culture prolongée en présence de galactose, les trois enzymes assurant le métabolisme de ce sucre, avec des activités comparables à celles de la souche CH-1. Cette souche ne présente, par conséquent, aucune déficience concernant les enzymes du métabolisme du galactose proprement dit.

TABLEAU 12

Dosage des enzymes du métabolisme du galactose

Activités comparées des souches de différents génotypes rapportées à 1 000 unités de G-1-P/PP uridylyltransférase :

(1 Unité = 10^{-4} μ mole de substrat transformé par minute et par mg de protéine).

Les dosages de galactokinase ont été effectués dans les mêmes conditions que celles décrites dans le tableau 11. La détermination à l'aide du galactose radioactif ne donne qu'une valeur minimum de l'activité galactokinase, car elle ne permet pas d'étudier la cinétique de la réaction. Toutefois cette méthode assure une sensibilité de l'ordre de 10^{-5} (μ moles/minute). L'incubation était de 60 minutes, mais pour l'homogénéité du tableau, les résultats ont été exprimés par minute. Les dosages de Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase, d'UDPGal-4-épimérase ainsi que de G-1-P/PP uridylyltransférase (enzyme de référence) ont été effectués selon les conditions décrites dans la partie technique (voir 3.9).

Génotype	Source de carbone pendant la culture	Galacto-kinase	Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase	UDPGal-4-épimérase
$g_1G_2G_3/G_1g_2G_3 \dots$	glucose	< 0,1	5	< 1
	acétate + galactose	50	550	159
$g_1G_2G_3 \dots \dots \dots$	glucose	< 0,1	< 1	< 1
	acétate + galactose	< 0,1	660	148
$G_1g_2G_3 \dots \dots \dots$	glucose	0,1	1	< 1
	acétate + galactose	47	350	158
$g_1g_2G_3 \dots \dots \dots$	glucose	< 0,1	< 1	2
	acétate + galactose	< 0,1	640	141

En raison de la forte tendance de 1238/5d à former des groupes de cellules, il n'a pas été possible de suivre la croissance de cette souche avec une précision satisfaisante. Celle-ci présente, toutefois, approximativement les mêmes caractéristiques que celles décrites par DOUGLAS et CONDIE (1954) pour d'autres souches portant l'allèle g_2 (voir figure 24) : croissance faible ou nulle aux concentrations de galactose inférieures à 1 mg/ml ; croissance comparable à celle de la souche témoin lorsque les concentrations de galactose atteignent 10 mg/ml.

Perméases chez les microorganismes :

Étant donné les résultats obtenus par DOUGLAS et CONDIE (1954), l'hypothèse selon laquelle la réaction contrôlée par le gène G_2 serait une « galactose-perméase » semblait très vraisemblable.

Avant d'entrer dans la partie expérimentale concernant cette question, il semble nécessaire de passer rapidement en revue les résultats acquis concernant les « perméases » bactériennes afin d'en dégager les critères permettant de caractériser l'existence éventuelle d'un tel système chez les levures portant l'allèle G_2 .

COHEN et RICKENBERG (1956), et RICKENBERG et coll. (1956) ont successivement montré l'existence, chez *E. coli*, de systèmes spécifiques de concentration vis-à-vis des acides aminés et des galactosides. Il serait en dehors du cadre de cet exposé de présenter une discussion détaillée des différentes théories qui ont été avancées pour expliquer les effets de concentration contre un gradient, observés avec différents organismes et de multiples métabolites.

Dans la revue que COHEN et MONOD (1957) ont consacrée à ce problème, il a été montré que l'hypothèse tendant à expliquer le phénomène de transport actif par la fixation sur des sites spécifiques (Schéma « stœchiométrique »), ne permet pas de rendre compte de tous les résultats d'une manière satisfaisante. Au contraire,

l'hypothèse selon laquelle le transport actif et sélectif de chaque métabolite serait dû à l'existence de systèmes spécifiques, de nature protéique, agissant selon un schéma « catalytique » est en accord avec l'ensemble des faits expérimentaux suivants :

1) *Concentration atteinte*. — L'importance des effets de concentration ⁽¹⁾ observés rend difficile la conception d'une fixation stœchiométrique — faute de pouvoir imaginer un nombre suffisant de sites spécifiques par cellule.

2) *Cinétique de concentration*. — La cinétique des phénomènes de concentration observée met en évidence un effet de saturation ; les vitesses obtenues permettent de calculer des K_m apparents qui sont de l'ordre de grandeur attendu pour des réactions de type enzymatique. La vitesse initiale d'entrée est indépendante de la concentration en galactosides (cf. KEPES et MONOD, 1957).

De plus, la nature protéique des systèmes de concentration spécifique semble être établie grâce aux faits suivants :

a) *Inductibilité*. — Le fait que certains de ces systèmes sont inductibles permet de postuler leur nature protéique.

b) *Action des inhibiteurs de la synthèse protéique*. — Les analogues d'acides aminés, ou le chloramphenicol, inhibent la formation induite des systèmes de concentration spécifique.

c) *Mutants dépourvus de systèmes de concentration*. — De nombreux mutants ont été isolés qui sont incapables de concentrer un métabolite donné : mutants cryptiques. Dans le cas de la galactoside-perméase, il a été montré que ce caractère est sous le contrôle d'un seul gène. La biosynthèse de ces systèmes est donc placée, comme toute protéine cellulaire spécifique, sous contrôle génique.

La nature protéique de tels systèmes, jointe à la forte probabilité en faveur de leur fonctionnement selon le mode catalytique permet de les rattacher à la classe des catalyseurs spécifiques, de nature protéique : les enzymes. COHEN et MONOD (1957) ont attribué à ces systèmes de concentration spécifique le nom général de « perméases ».

Les expériences décrites ci-dessous ont trait à la mise en évidence d'une « galactose-perméase » chez le mutant galactokinase-négatif (génotype $g_1G_2G_3$), et à son absence chez le mutant de génotype $G_1g_2G_3$. Le mutant galactokinase-négatif a été choisi pour cette étude car il a l'avantage de ne présenter aucun métabolisme du galactose. Il sera montré, de plus, que dans le cas de la souche CH-1 (génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$) les effets de concentration observés sont compliqués par la présence, chez cette souche, d'un métabolisme du galactose. Il sera montré en effet que cette dernière souche accumule, à partir du galactose, des réserves glucidiques présentant les caractéristiques du tréhalose.

Etude de la perméabilité des cellules de levure envers le galactose :

La perméabilité cellulaire envers le galactose a été mesurée d'après la technique déjà décrite (voir 3.10), sur des cellules de différents génotypes provenant, soit d'une culture sur glucose (cellules non-induites), soit d'une culture sur galactose (cellules induites).

(1) Jusqu'à présent ces systèmes de transport actif ont surtout été observés dans le cas où leur action se traduit par un effet de concentration du métabolite (ou de son analogue) à l'intérieur de la cellule. Cependant, les résultats de DOUDOROFF (1951), et DOUDOROFF et coll. (1956), par exemple, sont tout à fait compatibles avec l'existence de systèmes de transport actif qui ne concentrent pas. Dans ce cas, seule l'existence de mutants cryptiques permet de révéler l'existence de la perméase.

La figure 25 montre les résultats obtenus. Les constatations essentielles qui s'en dégagent sont les suivantes ⁽¹⁾ :

1) La perméabilité des cellules non-induites de la souche CH-1 diploïde (galactose-positive) est très faible.

2) Au contraire, les cellules de la même souche, ayant effectué leur croissance sur galactose, présentent une perméabilité très grande envers ce sucre.

3) La perméabilité au galactose des cellules induites de la souche portant l'allèle g_2 est très faible et à peine supérieure à celle des cellules de la souche CH-1 non-induites.

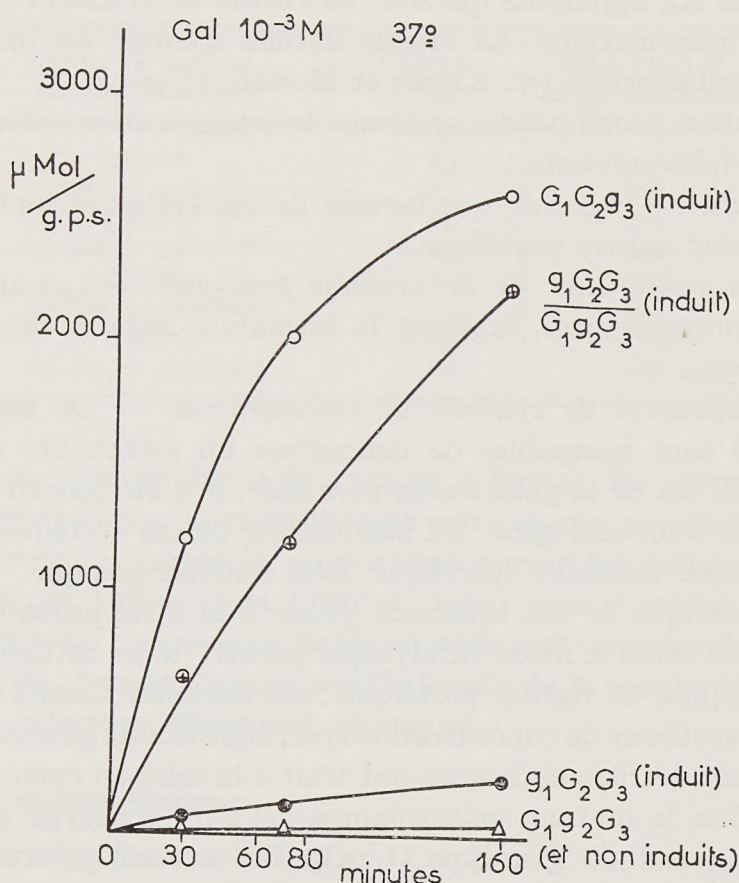


FIG. 25. — Incorporation intracellulaire du ^{14}C -galactose, dans les souches induites et non-induites de différents géotypes.

Galactose $10^{-1}M$; tampon TRIS pH 7,0, 0,1 M ; 37°C.

4) La perméabilité des cellules induites du mutant portant l'allèle dominant G_2 (géotype $g_1G_2G_3$) est de 8 à 10 fois supérieure à celle du mutant du géotype $G_1g_2G_3$.

5) La perméabilité des cellules induites du mutant galactokinase-négatif est néanmoins très inférieure à celle du diploïde induit.

6) Le mutant portant l'allèle récessif g_3 , induit, présente une perméabilité envers le galactose, au moins égale à celle du diploïde CH-1 induit.

Un certain nombre de conclusions peuvent être immédiatement déduites de ces constatations :

1) Il existe un système de transport actif du galactose permettant de concentrer ce sucre à l'intérieur de la cellule ⁽²⁾. La concentration intracellulaire atteinte

⁽¹⁾ Les données numériques seront présentées plus loin.

⁽²⁾ Calculé sur la base : 1 mg p.s. = 2 μ l Volume cellulaire interne (volume aqueux) (voir 3.10).

après 160 minutes représente environ 120 fois celle du milieu extérieur pour la souche $g_1G_2G_3$ et 1100 fois pour la souche CH-1.

2) Ce système de concentration est de caractère adaptatif, puisqu'il est absent des cellules non-induites (la cinétique de cette adaptation sera présentée dans le chapitre suivant).

3) La présence de ce système est sous le contrôle du gène G_2 , puisqu'il n'est pas formé dans les cellules induites portant l'allèle g_2 , bien que ces cellules possèdent toutes les enzymes du métabolisme du galactose (voir 5.2).

4) Les résultats obtenus en ce qui concerne les souches portant à la fois les allèles G_1 et G_2 (CH-1 et 1213/4c), c'est-à-dire capables, après induction, de métaboliser le galactose, laissent supposer que la capacité de concentrer le galactose est, soit sous le contrôle du même système que celui présent chez la souche 1235/2b, mais plus actif, soit sous le contrôle d'un système différent ou plus complexe.

5) Le couple d'allèles G_3/g_3 ne semble pas influencer la perméabilité induite envers le galactose.

Caractéristiques principales du système de transport actif du galactose.

Le système de concentration présent dans la souche galactokinase-négative sera considéré, dans la suite de ce travail, comme correspondant à la « galactose-perméase » « vraie » de *S. cerevisiae*. Les effets de concentration observés chez la

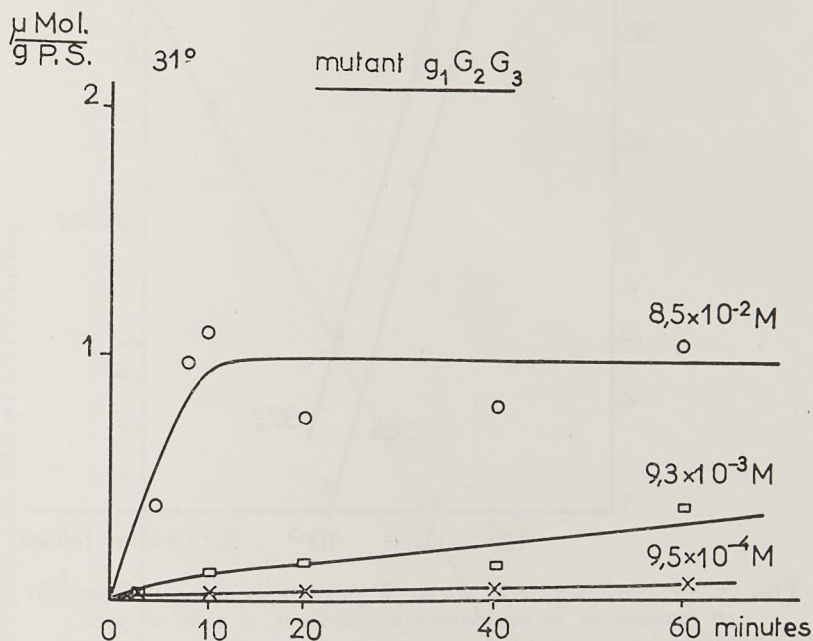


FIG. 26. — Concentration en galactose intracellulaire atteinte en fonction du temps et pour plusieurs concentrations externes de galactose. Expérience effectuée à 31°C.

souche CH-1, de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ (galactose-positive) seront étudiés plus loin.

1) *Vitesse de concentration.* — La figure 26 représente la cinétique de pénétration du galactose pour la souche de génotype $g_1G_2G_3$ (1235/2b), incubée avec trois concentrations différentes de ^{14}C galactose : 10^{-3} , 10^{-2} , et 10^{-1} M. Les résultats obtenus dans plusieurs expériences de ce type ont permis de tracer le graphique

de la figure 27 dans lequel les vitesses maxima ⁽¹⁾ sont portées en fonction de la concentration extérieure. La courbe coupe l'axe des ordonnées pour une valeur que l'on peut considérer comme la « vitesse maximum » du système (entre 28 et 37°) et qui est de l'ordre de 1 m mole par minute et par g poids sec.

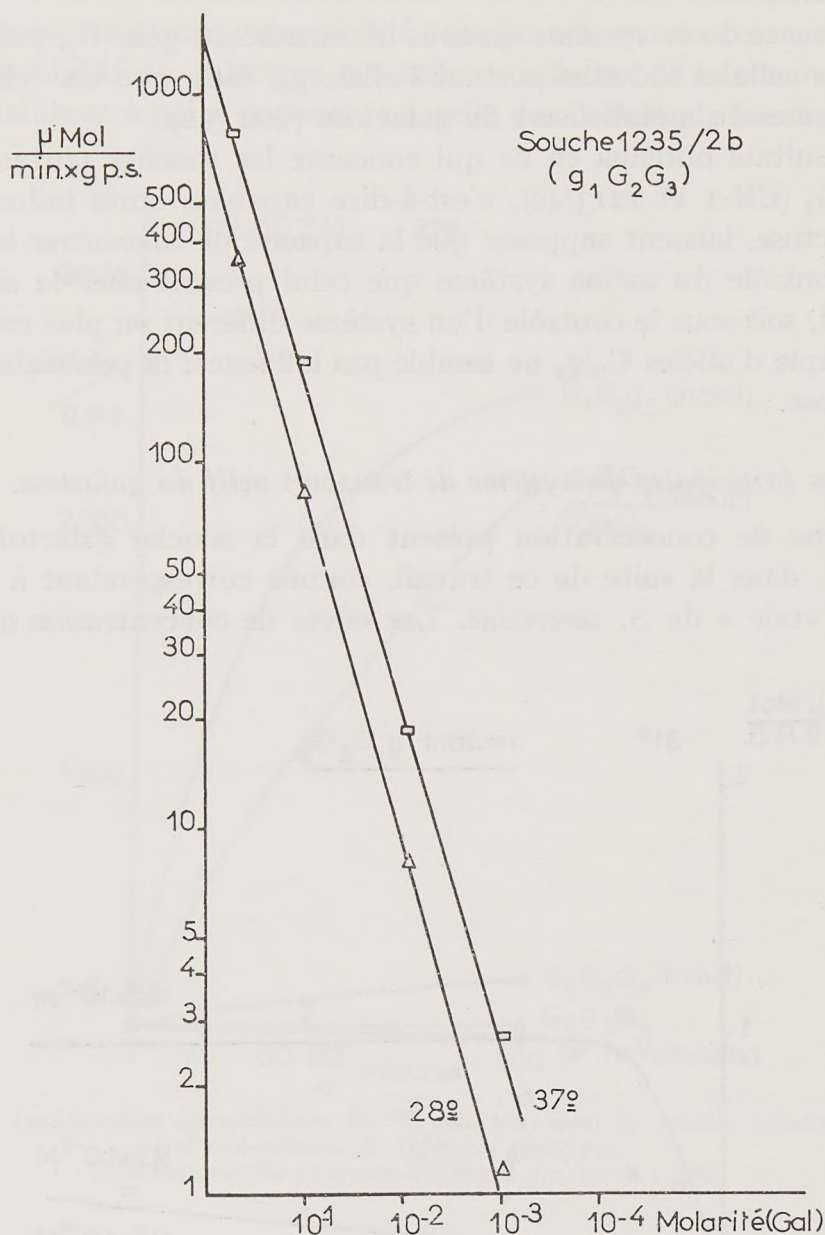


FIG. 27. — Variation de la vitesse de pénétration du galactose en fonction de sa concentration extérieure, à 28°C et 37°C. Souche galactokinase-négative (génotype $g_1G_2G_3$).

On voit que jusqu'à la concentration 0,5 M, on ne semble pas encore avoir atteint la saturation du système.

En effectuant les mesures sur des temps très courts, il est possible de se faire une idée plus précise des vitesses initiales. La figure 28 représente les résultats d'une expérience effectuée à 37° en présence de galactose 10^{-1} M. La vitesse initiale obtenue est de 590 μmoles par minute et par g de poids sec.

⁽¹⁾ Les vitesses maxima ont été calculées, d'une manière approximative, en traçant la tangente à l'origine ; ces vitesses sont exprimées en μmoles de galactose accumulées par minute et par g de poids sec.

Galactose externe $10^{-1}M$ - 31° - Souche galatokinase négative
($g_1 G_2 G_3$)

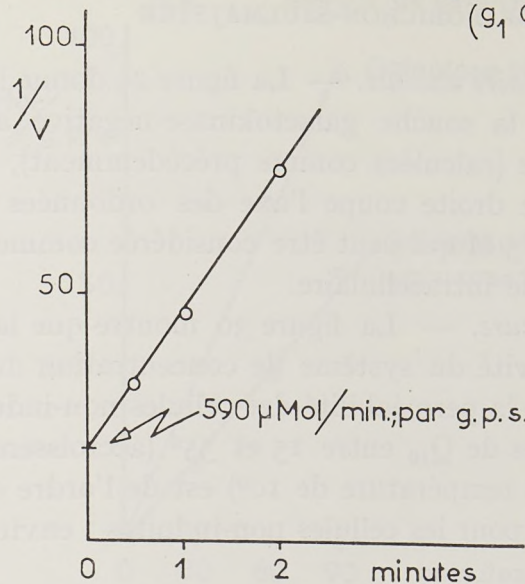


FIG. 28. — Vitesse initiale d' « entrée » du galactose.
Galactose externe $10^{-1} M$; $31^{\circ}C$; souche galactokinase-négative ($g_1 G_2 G_3$).

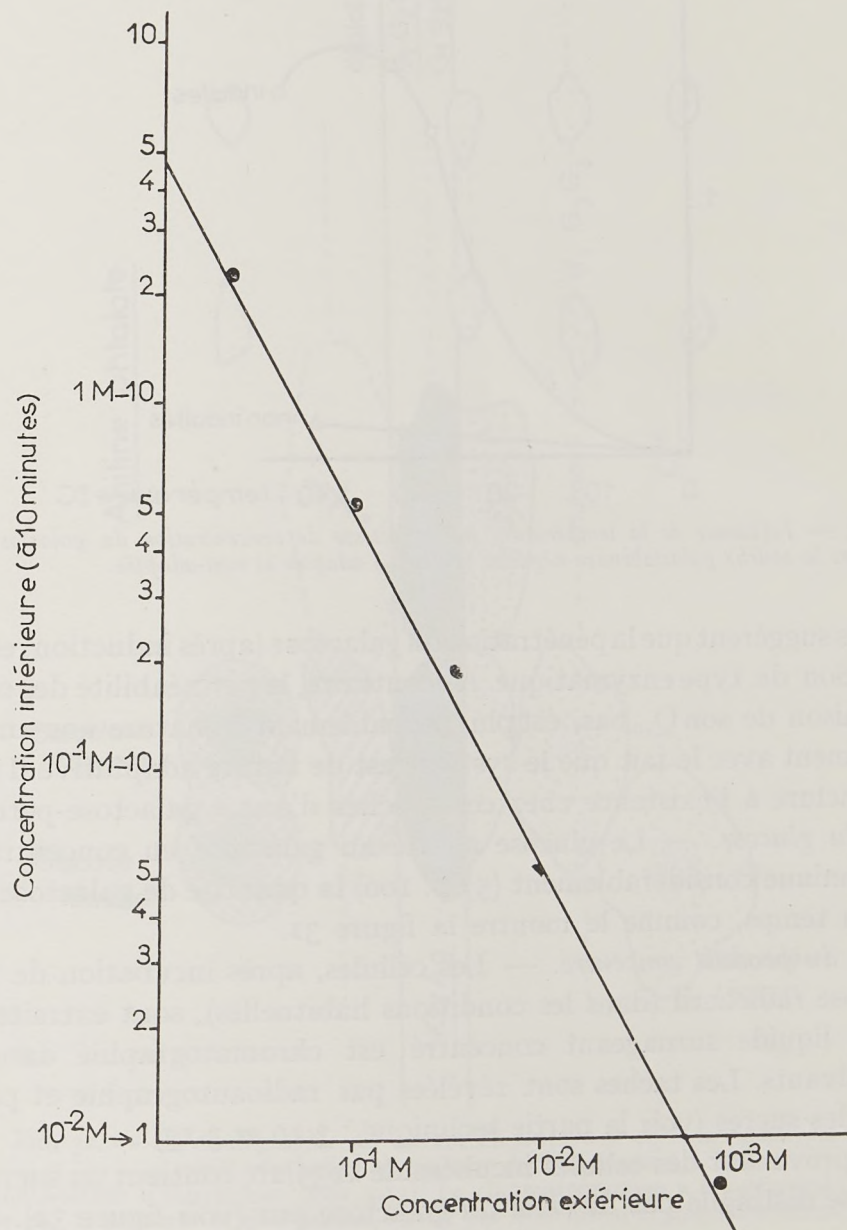


FIG. 29. — Effet de concentration du galactose chez la souche galactokinase-négative (génotype $g_1 G_2 G_3$).

2) *Concentration intracellulaire atteinte.* — La figure 29 donne les concentrations intracellulaires atteintes dans la souche galactokinase-négative après 10 minutes de contact avec le ^{14}C -galactose (calculées comme précédemment), en fonction de la concentration extérieure. Cette droite coupe l'axe des ordonnées en un point qui correspond à une valeur de 4 à 5 M qui peut être considérée comme la concentration maximum possible du galactose intracellulaire.

3) *Influence de la température.* — La figure 30 montre que la température influence considérablement l'activité du système de concentration du galactose, alors qu'elle n'influence que très peu la perméabilité des cellules non-induites.

Les valeurs approximatives de Q_{10} entre 15 et 35° (accroissement de la vitesse en fonction d'une différence de température de 10°) est de l'ordre de 3 pour les cellules induites et très inférieure pour les cellules non-induites : environ 0,5.

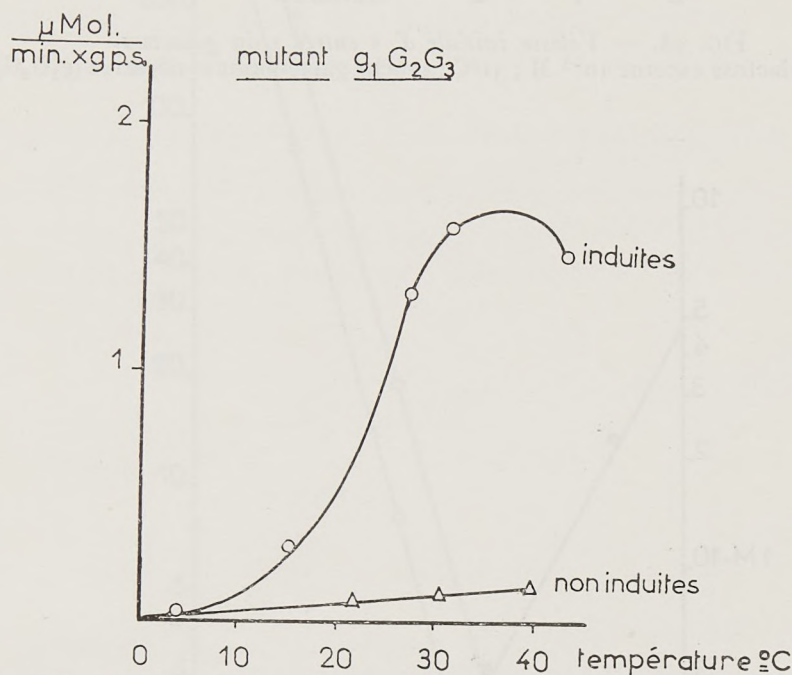


FIG. 30. — Influence de la température sur la vitesse de concentration du galactose chez la souche galactokinase-négative ($g_1G_2G_3$) adaptée et non-adaptée.

Ces valeurs suggèrent que la pénétration du galactose (après induction) est catalysée par une réaction de type enzymatique. Au contraire, la perméabilité des cellules non-induites, on raison de son Q_{10} bas, est plus probablement de nature non-enzymatique.

Conjointement avec le fait que le système est de nature adaptative il semble que l'on puisse conclure à l'existence chez ces souches d'une « galactose-perméase ».

4) *Effet du glucose.* — Le glucose ajouté au galactose en concentration équimoléculaire, diminue considérablement (57 p. 100) la quantité de galactose incorporée en fonction du temps, comme le montre la figure 31.

5) *Nature du produit concentré.* — Les cellules, après incubation de 15 minutes avec le galactose radioactif (dans les conditions habituelles), sont extraites par l'eau bouillante. Le liquide surnageant concentré est chromatographié dans plusieurs systèmes de solvants. Les taches sont révélées par radioautographie et par les réactions colorées des sucres (voir la partie technique : 3.10 et 3.13).

L'extrait provenant des cellules incubées de 1235/2b, contient un sucre radioactif dont le R_f ne se distingue pas de celui du galactose pur (voir figure 32).

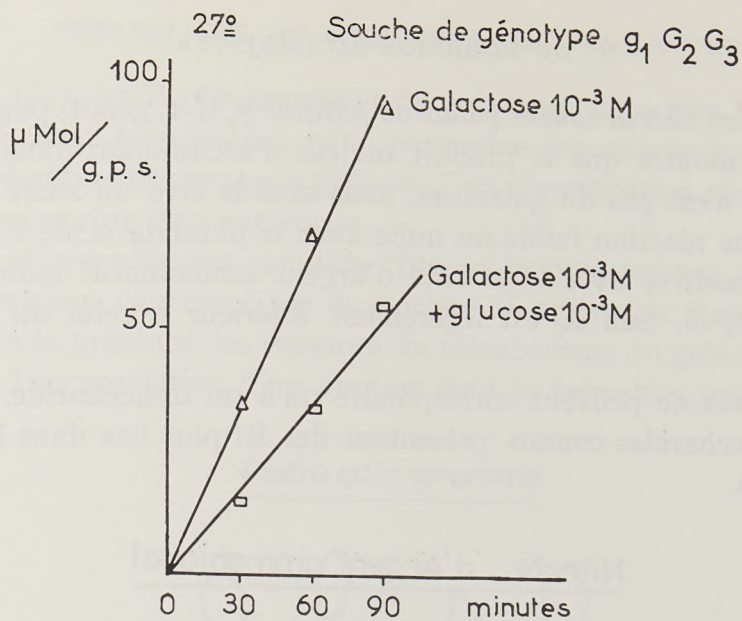


FIG. 31. — Effet du glucose sur la pénétration du galactose.
Souche de génotype $g_1 G_2 G_3$; 27°C.

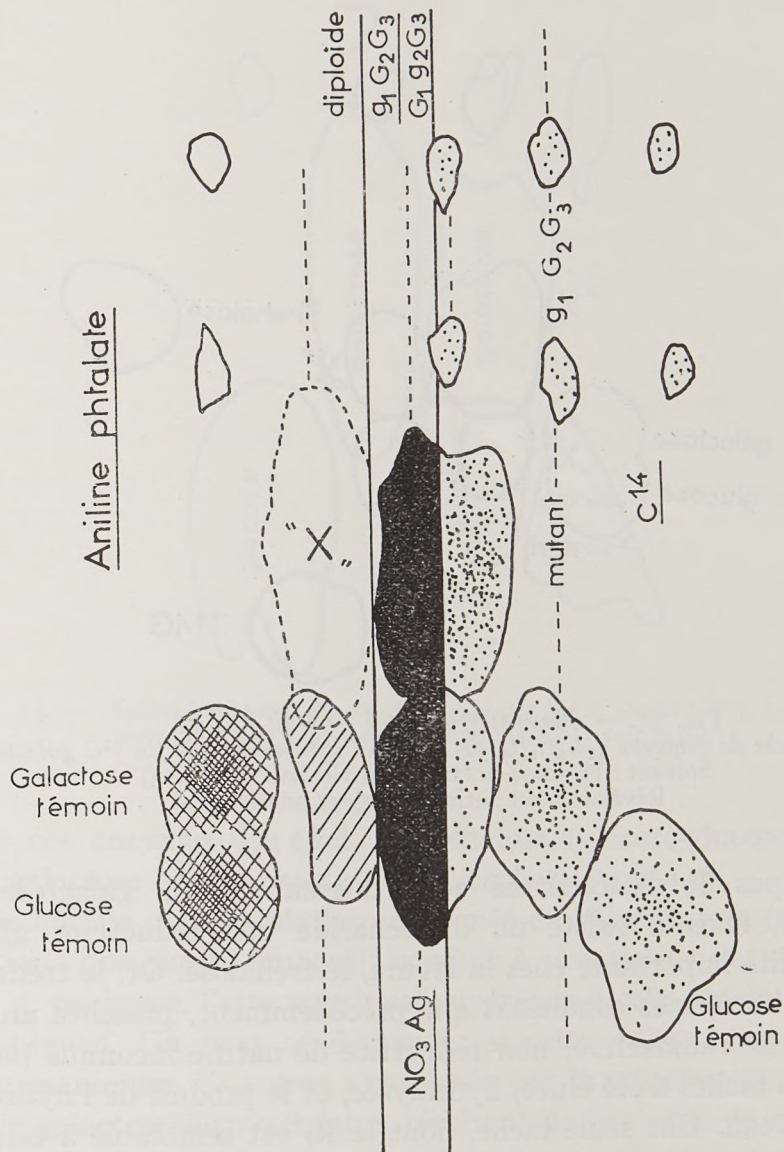


FIG. 32. — Chromatographie des extraits de souches de différents génotypes
après incubation en présence de ^{14}C galactose.

Solvant : Pyridine-Acétate d'éthyle-Eau (voir 3.13). Le chromatogramme a été découpé en bandes, l'une étant révélée par le phthalate acide d'aniline, l'autre par le nitrate d'argent ammoniacal ; l'emplacement des composés radio-actifs a été révélé par autoradiographie.

Souche : diploïde CH-1 et 1235/2b ($g_1 G_2 G_3$).

2) *Concentration intracellulaire atteinte.* — La figure 29 donne les concentrations intracellulaires atteintes dans la souche galactokinase-négative après 10 minutes de contact avec le ^{14}C -galactose (calculées comme précédemment), en fonction de la concentration extérieure. Cette droite coupe l'axe des ordonnées en un point qui correspond à une valeur de 4 à 5 M qui peut être considérée comme la concentration maximum possible du galactose intracellulaire.

3) *Influence de la température.* — La figure 30 montre que la température influence considérablement l'activité du système de concentration du galactose, alors qu'elle n'influence que très peu la perméabilité des cellules non-induites.

Les valeurs approximatives de Q_{10} entre 15 et 35° (accroissement de la vitesse en fonction d'une différence de température de 10°) est de l'ordre de 3 pour les cellules induites et très inférieure pour les cellules non-induites : environ 0,5.

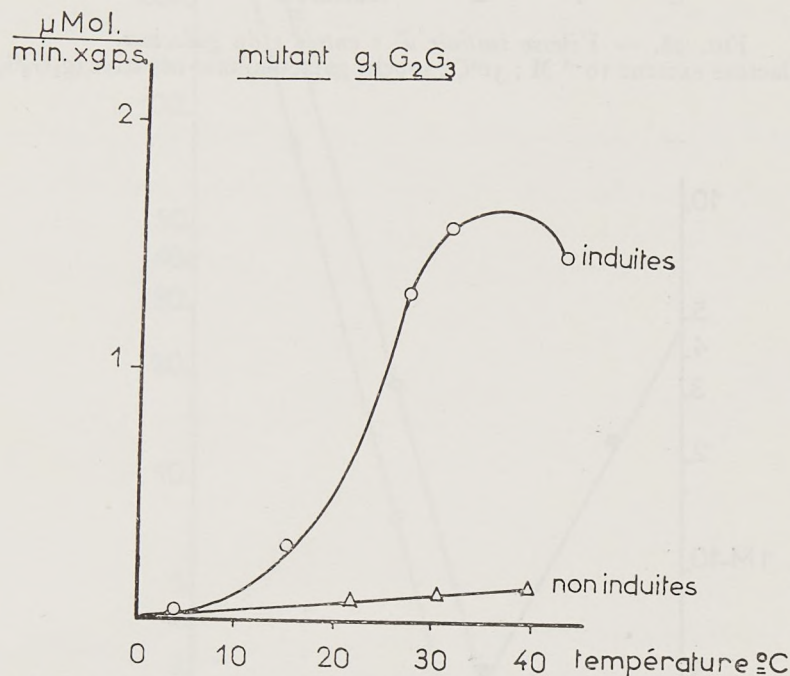


FIG. 30. — Influence de la température sur la vitesse de concentration du galactose chez la souche galactokinase-négative ($g_1G_2G_3$) adaptée et non-adaptée.

Ces valeurs suggèrent que la pénétration du galactose (après induction) est catalysée par une réaction de type enzymatique. Au contraire, la perméabilité des cellules non-induites, on raison de son Q_{10} bas, est plus probablement de nature non-enzymatique.

Conjointement avec le fait que le système est de nature adaptative il semble que l'on puisse conclure à l'existence chez ces souches d'une « galactose-perméase ».

4) *Effet du glucose.* — Le glucose ajouté au galactose en concentration équimoléculaire, diminue considérablement (57 p. 100) la quantité de galactose incorporée en fonction du temps, comme le montre la figure 31.

5) *Nature du produit concentré.* — Les cellules, après incubation de 15 minutes avec le galactose radioactif (dans les conditions habituelles), sont extraites par l'eau bouillante. Le liquide surnageant concentré est chromatographié dans plusieurs systèmes de solvants. Les taches sont révélées par radioautographie et par les réactions colorées des sucres (voir la partie technique : 3.10 et 3.13).

L'extrait provenant des cellules incubées de 1235/2b, contient un sucre radioactif dont le R_f ne se distingue pas de celui du galactose pur (voir figure 32).

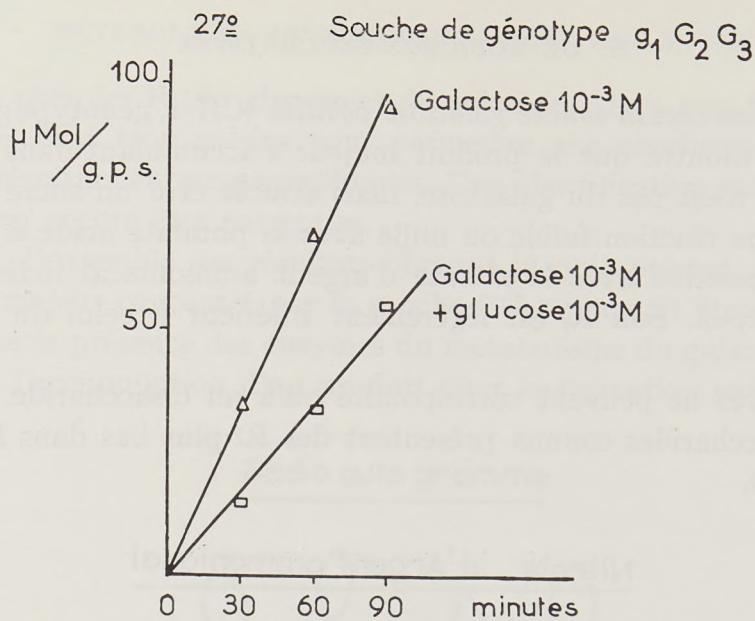


FIG. 31. — Effet du glucose sur la pénétration du galactose.
Souche de génotype $g_1 G_2 G_3$; 27°C.

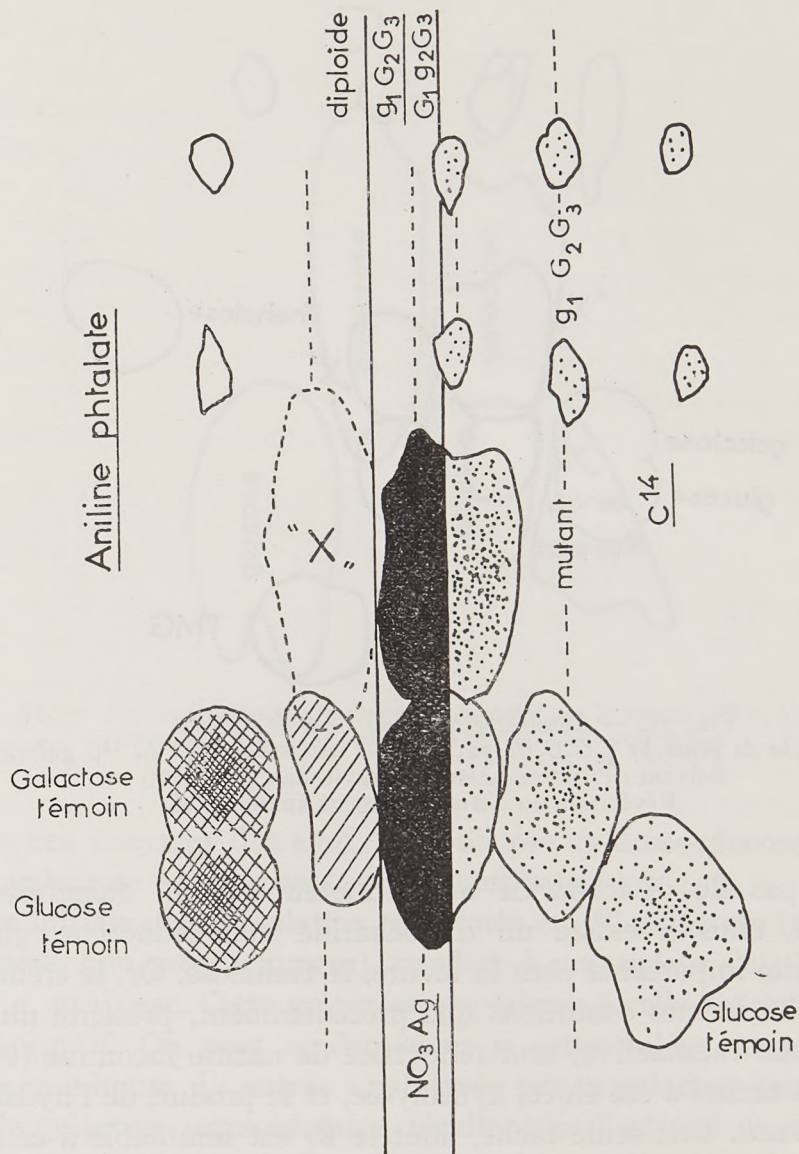


FIG. 32. — Chromatographie des extraits de souches de différents génotypes
après incubation en présence de ^{14}C galactose.

Solvant : Pyridine-Acétate d'éthyle-Eau (voir 3.13). Le chromatogramme a été découpé en bandes, l'une étant révélée par le phthalate acide d'aniline, l'autre par le nitrate d'argent ammoniacal ; l'emplacement des composés radio-actifs a été révélé par autoradiographie.
Souche : diploïde CH-1 et 1235/2b ($g_1 G_2 G_3$).

Effet de concentration chez la souche galactose-positive (CH-1, génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$).

La figure 32 montre que le produit majeur s'accumulant dans les cellules de génotype sauvage n'est pas du galactose, mais semble être un sucre non-réducteur, puisqu'il donne une réaction faible ou nulle avec le phtalate acide d'aniline. Toutefois, sa réaction positive avec le nitrate d'argent ammoniacal indique qu'il s'agit toujours d'un poly-ol. Son R_f est légèrement inférieur à celui du galactose (voir figure 33).

Les R_f observés ne peuvent correspondre qu'à un disaccharide. En effet, tous les tri- ou poly-saccharides connus présentent des R_f plus bas dans les systèmes de solvants employés.

Nitrate d'Argent ammoniacal

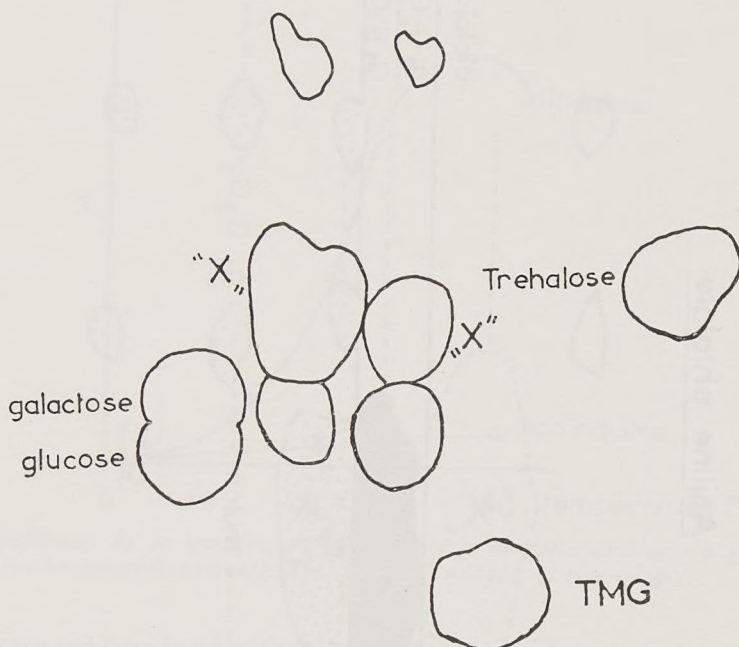


FIG. 33. — Chromatographie de l'extrait aqueux de la souche de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$, après incubation avec du ^{14}C galactose. Solvant : Pyridine-Acétate d'éthyle-Eau (voir 3.13) Révélation au Nitrate d'argent ammoniacal.

Il n'existe pas de disaccharide non-réducteur connu, galactose-galactose ou galactose-glucose, mais il existe un disaccharide non réducteur, glucose-glucose, présent en quantité importante chez la levure, le tréhalose. Or, le tréhalose, chromatographié dans les mêmes conditions que précédemment, présente un R_f identique à celui de la tache radioactive, non réductrice de nature inconnue (voir figure 33).

L'une de ces taches a été éluée, hydrolysée, et le produit de l'hydrolyse chromatographié à nouveau. Une seule tache, dont le R_f est semblable à celui du glucose, a pu être mise en évidence à partir de cet hydrolysats (figure 34).

Ces résultats ne doivent toutefois être considérés que comme préliminaires. En effet, les quantités de produit récupérées après ces diverses manipulations étaient

très faibles. De plus, les R_f du glucose et du galactose, dans tous les systèmes de solvants employés, sont trop voisins pour permettre une conclusion définitive sur la seule base des résultats chromatographiques. Une identification plus poussée de cette substance n'a pu encore être entreprise.

Cependant, l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent, suggère fortement que le produit majeur concentré par la souche CH-1 pourrait être du *tréhalose*.

On voit que la présence des enzymes du métabolisme du galactose conduit, chez cette souche, à l'accumulation d'un produit dont la formation requiert la participa-

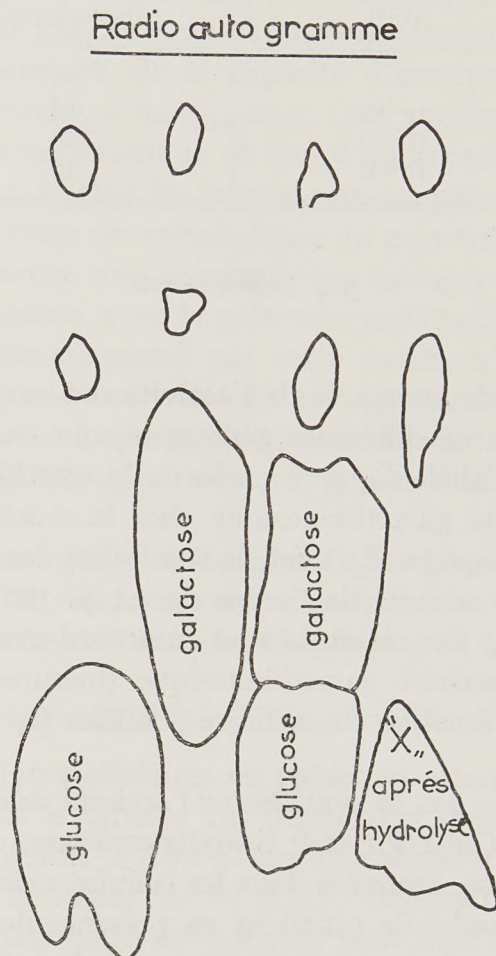


FIG. 34. — Autoradiogramme du composé concentré par la souche CH-1, hydrolysé.
Solvant : Pyridine-Acétate d'éthyle-Eau voir 3.13).

tion de toutes ces enzymes. En effet, le tréhalose (glucose-glucose) exige la transformation du galactose en glucose-1, ou 6-phosphate (voir 4.1).

La vitesse initiale d'accumulation, exprimée en ^{14}C -galactose (mesurée dans les mêmes conditions que précédemment), conduit à une valeur de : 1670 μmoles par minute et par g. poids sec. Cette valeur est supérieure à celle obtenue avec le mutant galactokinase-négatif. On peut se demander si cette valeur ne représente pas la vitesse initiale maximum d'« entrée » catalysée par la galactose-perméase. En effet, dans ce cas, le galactose intracellulaire, résultant de l'activité de ce système galactose-perméase, se trouve continuellement soustrait pour être transformé en tréhalose, empêchant ainsi la valeur d'équilibre propre à la galactose-perméase d'être atteinte.

Le glucose inhibe l'accumulation du tréhalose chez la souche CH-1. Les

valeurs présentées dans le tableau I3 montrent que cette inhibition peut devenir à peu près totale lorsque la concentration du glucose est 100 fois plus élevée que celle du galactose.

TABLEAU I3

Effet du glucose sur la concentration du galactose par la souche CH-1

Incubation pendant 5 minutes à 25°

Galactose (C ¹² + C ¹⁴)	Glucose (C ¹²)	Galactose concentré (μmoles/g.p.s.)	Inhibition %
10 ⁻³ M	—	131	—
10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	89	32
10 ⁻³ M	10 ⁻² M	28	79
10 ⁻³ M	10 ⁻¹ M	12	91

5.4 DISCUSSION

Rôle du gène G₁.

Les résultats de l'étude comparée de l'activité des enzymes du métabolisme du galactose chez les souches de différents génotypes sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle le couple d'allèle G₁/g₁ contrôle la biosynthèse induite de la galactokinase. L'absence d'activité galactokinase chez la souche portant l'allèle g₁ peut être considérée comme complète. En effet, la sensibilité des méthodes utilisées aurait permis la détection d'une activité de l'ordre de 0,1 p. 100 de l'activité des cellules induites portant l'allèle G₁. Ces résultats sont en accord avec ceux de NELSON (1955) qui avait montré que l'activité galactokinase (mesurée par formation d'esters phosphorylés stables) est fonction du nombre d'allèles G₁ présents dans les levures tétraploïdes.

Le gène G₁ ne modifie pas la synthèse ou l'activité des autres enzymes du galactose : les activités de la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase, de l'UDPGal-4-épimérase et de la Galactose-perméase, trouvées dans les cellules ayant proliféré en présence de galactose, sont du même ordre de grandeur en présence des allèles G₁ ou G₂. Il sera montré dans le chapitre suivant que la vitesse de leur biosynthèse induite est la même dans les deux cas. Le gène G₁ semble donc contrôler de manière absolue la biosynthèse de la galactokinase. De plus, il n'intervient pas dans le contrôle des autres enzymes du métabolisme qui ont été étudiées. Ceci constitue une illustration supplémentaire de la théorie de BEADLE (1945) : « un gène — une enzyme ».

D'autre part, le fait que le mutant de génotype g₁G₂G₃ soit incapable d'utiliser le galactose pour sa croissance, amène à la conclusion qu'il n'existe pas chez *S. cerevisiae* d'autre voie métabolique de l'utilisation du galactose que celle qui a été décrite au chapitre 4.

Rôle du gène G₂.

Galactose-perméase. — La mesure de la perméabilité envers le galactose des cellules de différents génotypes a permis de mettre en évidence l'existence d'une galactose-perméase dans les souches portant l'allèle G₂. Selon les méthodes employées, le produit concentré par la souche de génotype g₁G₂G₃ correspond à du galactose libre.

Au contraire, la souche portant l'allèle g_2 , cultivée en présence de galactose, se montre incapable de concentrer ce sucre.

Les propriétés inductibles de ce système suggèrent sa nature protéique. Son activité catalytique l'apparente, de même que les perméases déjà connues (voir COHEN et RICKENBERG, 1956 ; RICKENBERG et coll., 1956), à un système enzymatique.

Il semble donc que le gène G_2 contrôle, chez *S. cerevisiae*, la biosynthèse induite d'un système de nature enzymatique appelé « galactose-perméase ».

Il existe toutefois, chez la souche de génotype $G_1g_2G_3$, une activité résiduelle (tableau 14) variable selon les conditions, mais pouvant atteindre un effet de concentration de l'ordre de deux fois par rapport à la concentration extérieure. La variation, en fonction de la température, de la capacité d'incorporer le galactose radioactif, correspond, chez cette souche, à un Q_{10} de 3. Ceci montre qu'il s'agit probablement d'une activité de nature enzymatique et non d'un accroissement de la perméabilité physique dont le Q_{10} est 0,5 (chez les levures non-adaptées) (voir fig. 30).

La présence des enzymes du métabolisme du galactose dans cette souche, après induction, pourrait permettre une accumulation ménagée des produits de son métabolisme, pendant l'incubation avec le galactose radioactif.

La nature du produit concentré par cette souche n'a pas été établie. Il n'est donc pas possible de dire si l'activité répond au fonctionnement des enzymes du métabolisme du galactose ou à une faible biosynthèse de la galactose-perméase, c'est-à-dire si la présence de l'allèle g_2 correspond ou non à une perte totale de l'activité perméasique.

En tous cas, de même que pour le gène G_1 , le gène G_2 ne semble pas affecter la biosynthèse, ou l'activité, des autres enzymes du métabolisme du galactose, comme il ressort des résultats présentés dans les chapitres 4 et 6.

Perméabilité physique et importance physiologique de la galactose-perméase.

Les concentrations intracellulaires en galactose atteintes dans les cellules non-induites (reproduites dans le tableau 14) permettent d'estimer le volume cellulaire perméable à ce sucre à environ 50 à 70 p. 100 du volume total. Ceci correspond d'une manière satisfaisante à la valeur de 66 p. 100 déterminée par d'autres méthodes (LINDENBERG et coll., 1949) qui a été adoptée pour tous les calculs effectués ici.

Les résultats résumés dans les tableaux 14 et 15 permettent d'attirer l'attention sur un point important de la physiologie intracellulaire des levures.

TABLEAU 14
Perméabilité des cellules non induites

Souches	CH-1	1 235/2b	Résultats de BURGER et coll.
Température	28°	28°	30°
Concentration extérieure du galactose	$10^{-3}M$	$10^{-3}M$	$3 \times 10^{-1}M$
Concentration intracellulaire après 10 min.	$1,0 \times 10^{-3}M$	$0,37 \times 10^{-3}M$	—
Après 90 min.	$3,0 \times 10^{-3}M$ (1)	$0,7 \times 10^{-3}M$	$1,4 \times 10^{-1}M$

(1) Cette valeur plus élevée peut être due à un début d'adaptation pendant la durée de l'incubation.

TABLEAU 15

Vitesses d'incorporation du galactose dans différentes conditions μ moles par minute et par gramme de poids sec

Température	Galactose	10 ⁻³ M		10 ⁻¹ M
		28°	37°	28°
<i>Souches induites :</i>				
<i>g</i> ₁ <i>G</i> ₂ <i>G</i> ₃		1,0	2,5	82
<i>G</i> ₁ <i>g</i> ₂ <i>G</i> ₃		0,11	0,3	---
<i>g</i> ₁ <i>G</i> ₂ <i>G</i> ₃ / <i>G</i> ₁ <i>g</i> ₂ <i>G</i> ₃ (CH-1).....		8,0	25	240
<i>Souches non-induites :</i>				
<i>g</i> ₁ <i>G</i> ₂ <i>G</i> ₃		0,07	0,09	8,5
<i>G</i> ₁ <i>g</i> ₂ <i>G</i> ₃		0,07	0,09	---
<i>g</i> ₁ <i>G</i> ₂ <i>G</i> ₃ / <i>G</i> ₁ <i>g</i> ₂ <i>G</i> ₃ (CH-1).....		0,16	0,25	18,0
<i>S. cerevisiae non induit</i> (selon BURGER et coll., 1959).				
Galactose 3 × 10 ⁻¹ M, 30°		6,7		

Les cellules de levure, adaptées au galactose, sont capables de métaboliser ce substrat par respiration ou fermentation aussi bien que le glucose, c'est-à-dire avec un QO_2 optimum d'environ 120 et un QCO_2 optimum d'environ 300 (voir chapitre suivant). Ces valeurs correspondent à la consommation de 15 μ moles par g de poids sec et par minute pour la fermentation, lorsque la concentration du galactose est 0,1 M.

Le tableau 15 montre que les valeurs trouvées au cours de ce travail, aussi bien que celles trouvées par d'autres auteurs (BURGER et coll., 1959), pour les vitesses de pénétration du galactose dans les cellules de *S. cerevisiae* non-induites se situent entre 6 et 18 ⁽¹⁾ μ moles par g de poids sec et par minute, pour une concentration extérieure de 10⁻¹ M.

On voit donc que la « perméabilité physique » des cellules envers le galactose risquerait d'être limitante pour la respiration de ce sucre. Elle est, en tous cas, très inférieure à la vitesse de pénétration requise pour assurer les QCO_2 observés. Il semble par conséquent évident, à priori, que l'existence d'un mécanisme assurant une perméabilité accrue envers ce substrat devait être postulée (à moins d'admettre que la localisation des enzymes fermentaires soit telle qu'elles puissent être saturées malgré la faible concentration). En fait, les valeurs trouvées, même après induction de la galactose-perméase, sont du même ordre de grandeur que celles requises pour satisfaire une fermentation optimum du galactose. Il est donc concevable que, dans certains cas, le fonctionnement de la galactose-perméase puisse être le facteur limitant de la fermentation du galactose par *S. cerevisiae*.

Sols et coll. (1958) ont signalé l'existence d'une « hexose-transportase » chez les levures « Sauternes » qui serait la réaction limitant la fermentation des hexoses tels que glucose, fructose et mannose.

(1) Il est possible que la valeur : 18 μ moles par g poids sec et par minute, trouvée pour la souche galactose-positive CH-1, non-induite, ne corresponde pas seulement à sa perméabilité physique envers le galactose, mais reflète un certain niveau de galactose-perméase constitutive (voir chapitre 6).

Utilisation préférentielle.

Au cours du phénomène de diauxie, mis en évidence par MONOD (1942), on observe, lorsqu'un microorganisme dispose de deux sources carbonées, l'utilisation préférentielle de l'un des deux substrats, l'utilisation de second substrat ne commençant qu'après épuisement du premier.

On connaît le rôle inhibiteur du glucose (ou de toute substance énergétique dont le métabolisme est suffisamment rapide, NIEDHART et MAGASANIK, 1957) sur la biosynthèse induite des enzymes. Dans le cas où l'utilisation de l'un des substrats met en cause des enzymes constitutives (le glucose, par exemple), tandis que l'utilisation de l'autre substrat exige la biosynthèse induite d'une ou plusieurs enzymes, on doit s'attendre à un effet de diauxie.

Toutefois, dans les cas où les deux systèmes de dégradation sont constitutifs, ou bien lorsqu'il y a eu pré-induction, la compétition des deux substrats au niveau des perméases pourrait également provoquer l'utilisation préférentielle de l'un des deux substrats.

Dans le cas présent (inter-relation glucose-galactose) la pénétration du glucose ne peut pas être normalement catalysée par la galactose-perméase puisque celle-ci n'est présente qu'après induction par la galactose. Cependant, l'affinité du glucose pour la galactose-perméase, une fois celle-ci induite, est capable d'inhiber la pénétration du galactose.

Ces résultats montrent que, même dans certains cas où les cellules possèdent tout l'équipement enzymatique nécessaire pour attaquer conjointement deux substrats, l'existence d'effets compétitifs au niveau des perméases peut avoir pour résultat que l'un seulement des deux substrats sera attaqué préférentiellement.

Formation et accumulation de « tréhalose » à partir du galactose incorporé dans la souche CH-1.

Bien que la substance concentrée par le diploïde CH-1 n'ait pas été déterminée d'une manière définitive, les indications en faveur de son identité avec le tréhalose semblent suffisamment suggestives pour autoriser la discussion du rôle que cette substance peut remplir dans l'assimilation du galactose.

Les travaux de TREVELYAN et coll. (*cf.* TREVELYAN, 1958) ont apporté de nombreuses indications concernant l'importance du tréhalose en tant que substance de réserve chez les levures. Il en sera retenu les points suivants :

1) Le tréhalose n'est pas essentiel au maintien de la structure cellulaire, comme semblent l'être, à des degrés divers, les autres glucides de la levure : glucanes, mannanes, et glycogène, puisque les cellules de la levure peuvent, sans aucun dommage apparent, en être totalement dépourvues.

2) Dans des conditions de métabolisme intense des glucides (surtout en aérobiose et en absence d'une source azotée), le tréhalose peut représenter jusqu'à 40 p. 100 des réserves carbonées de la levure.

3) Le tréhalose semble être en équilibre dynamique avec le métabolisme d'hexoses tels que glucose, fructose, sucrose, mannose. L'utilisation de ces sucres s'accompagne tout d'abord d'une dégradation puis d'une re-synthèse du tréhalose intracellulaire. Un échange intense peut être mis en évidence grâce à l'utilisation, soit des sucres radioactifs, soit d'un marquage préliminaire du « pool » de tréhalose.

Il avait déjà été suggéré par WILLSTÄTTER et ROHDEWALD (1937) que le passage par le glycogène pouvait constituer la première étape du métabolisme du glucose. On peut se demander si tel n'est pas le cas du tréhalose. Les expériences d'incorporation de la radioactivité provenant du galactose dans le composé correspondant au tréhalose, chez la souche CH-I, semblent l'indiquer. En effet, dans certains cas, la radioactivité retrouvée dans la tache « tréhalose » représentait environ 90 p. 100 de la radioactivité incorporée.

Dans ces conditions (galactose en excès, absence de croissance, temps d'incubation relativement court), le catabolisme du galactose ne semble donc soustraire qu'une part très faible, ou nulle, du galactose incorporé. Un phénomène semblable a déjà été observé à plusieurs reprises au cours de l'utilisation du glucose par les

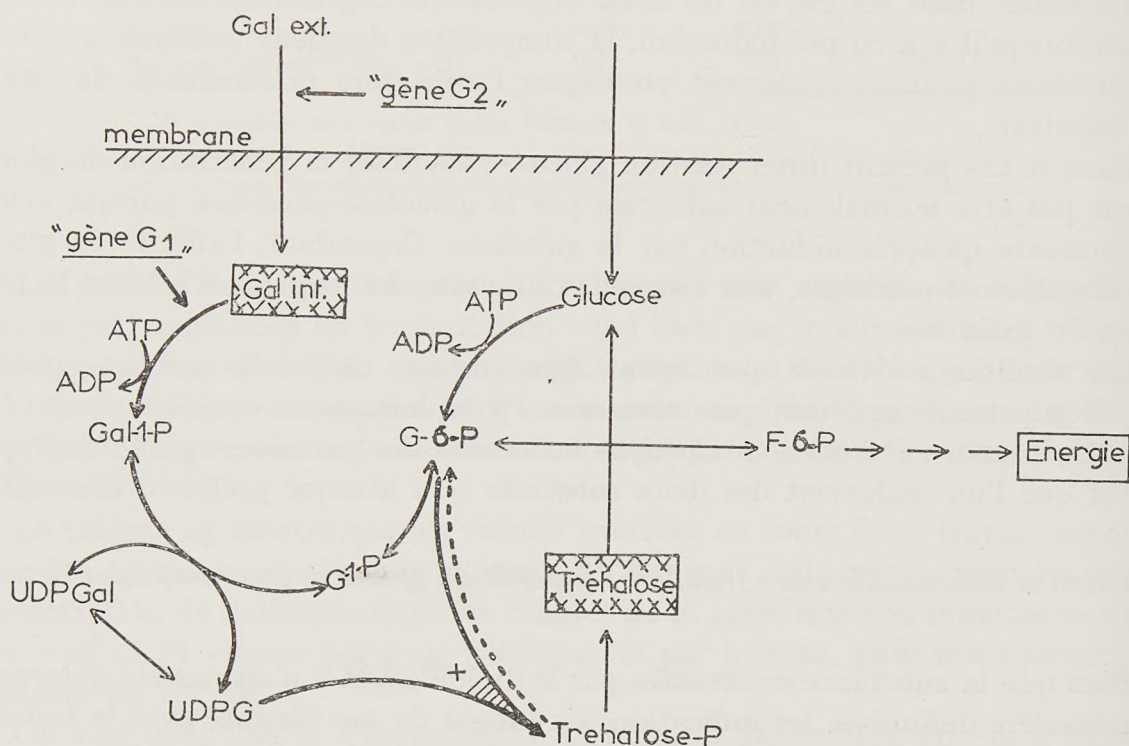


Schéma général du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae*

FIG. 35. — Schéma général du métabolisme du galactose chez *Saccharomyces cerevisiae* ; lieu d'intervention des gènes G_1 et G_2 .

levures. En particulier, WINZLER (1940) a pu montrer qu'en aérobiose et dans certaines conditions, 74 p. 100 du glucose métabolisé peut être « assimilé ».

Dans ces conditions, le schéma du catabolisme du galactose, chez les levures, tel qu'il avait été précédemment décrit (voir figure 7), doit être complété. En effet, le glucose (provenant du galactose) ne serait pas le produit exclusif de l'activité de la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, comme cela a été admis jusqu'à maintenant. La réaction d'épimérisation : $\text{UDPGal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$ ne serait plus seulement catalytique (resynthèse de l'UDPG), mais devrait fournir la quantité stœchiométrique d'UDPG, nécessaire à la biosynthèse du tréhalose ($\text{UDPG} + \text{G-6-P} \rightarrow \text{Tréhalose 6-P} + \text{UDP}$). Le schéma de la figure 12 devrait alors être remplacé par le schéma de la figure 35.

On voit que ce schéma permet d'expliquer l'existence de deux « pools » intracellulaires formés à partir du galactose : l'un est le pool du galactose libre résultant de l'activité de la galactose-perméase, seule présente dans la souche galactokinase-négative ; l'autre est le pool du tréhalose qui ne peut être alimenté qu'après isomérisation du galactose en glucose et n'est, par conséquent, présent que chez les souches capables de métaboliser le galactose.

La dépense énergétique exigée par la constitution de ce pool (deux ATP supplémentaires, l'un pour former l'UDPG consommé, l'autre pour phosphoryler l'un des résidus de glucose, après hydrolyse du tréhalose) ne serait vraiment intéressante qu'en aérobiose. En anaérobiose, le rendement serait moins efficace puisqu'il faudrait consommer trois ATP pour en reformer quatre ⁽¹⁾, ce qui ne semble pas très rentable. Ceci est en accord avec le fait que c'est en aérobiose seulement qu'on observe la constitution *de novo* d'un « pool » de tréhalose par les levures (voir TREVELYAN, 1958).

Rappelons que ce « pool » de tréhalose n'est pas spécifique du métabolisme du galactose, mais peut être rechargé à partir d'autres sucres, fructose, mannose, etc.

Le fait que les levures de génotype $G_1g_2G_3$ (perméase-négatives) n'incorporent pas la radioactivité du galactose dans le tréhalose, indique que des concentrations intracellulaires élevées de galactose sont probablement nécessaires pour la constitution de ce pool.

La constitution d'un « pool » de tréhalose peut présenter deux avantages pour la cellule :

1) Il a été signalé par plusieurs auteurs (voir TREVELYAN, 1958) que le tréhalose semble être relativement peu dégradé *in vivo*, chez la levure, à moins de se placer dans des conditions de carence carbonée. La possibilité de convertir différents sucres en tréhalose permettrait donc, lorsqu'il y a abondance, de les mettre à l'abri des dégradations enzymatiques.

2) L'existence d'une galactose-perméase occasionne probablement, aux concentrations extérieures élevées de galactose, une forte pression osmotique intracellulaire. La transformation du galactose en tréhalose constituerait, de ce point de vue, une soupape, permettant de diminuer la pression osmotique de moitié.

Remarques concernant le rôle du gène G_3 :

Aucune des expériences effectuées au cours de ce travail n'a eu pour but de déterminer le rôle de ce gène. Toutefois, le mutant de génotype $G_1G_2g_3$ ayant été inclus dans quelques expériences, il a pu être montré qu'après induction, les cellules de ce génotype incorporent le ^{14}C -galactose en quantité au moins égale, sinon supérieure, à celle que l'on observe dans le cas du diploïde CH-1. On sait, d'autre part, que les souches portant l'allèle g_3 sont capables, après induction, de métaboliser et d'utiliser le galactose pour la croissance, aussi bien que des souches de génotype sauvage (voir l'introduction de ce chapitre 5.1).

Ceci est en accord avec l'hypothèse (voir 5.1) selon laquelle le gène G_3 exerce son action sur un type de régulation différent d'une réaction métabolique proprement dite (formation ou activation d'un « template » ; antagonisme vis-à-vis d'un répresseur ; induction d'une perméase spécifique, etc.). On pourrait en effet penser

⁽¹⁾ Il est généralement admis que le rendement de la respiration se situe aux environs de 12 ATP/glucose, tandis que celui de la fermentation est de 4 ATP/glucose.

que la galactose-perméase, bien qu'étant normalement active une fois formée, est induite avec une cinétique très lente (*cf.* COHN, 1957). Ceci expliquerait d'ailleurs la cinétique exponentielle de l'induction de la capacité de fermenter le galactose chez ces souches. En effet, en l'absence d'une perméase active, la quantité d'énergie serait limitante et, au fur et à mesure que la perméase se formerait, la cinétique s'accéléderait, jusqu'au moment où l'apport énergétique devenant excédentaire, la cinétique deviendrait linéaire.

Contrôle génique des autres réactions du métabolisme du galactose :

Il vient d'être montré que deux des gènes connus qui intéressent le métabolisme du galactose chez les levures contrôlent la présence de deux enzymes intervenant dans le métabolisme de ce sucre : la galactose-perméase et la galactokinase.

On ne connaît pas, à l'heure actuelle, de mutant de levure dépourvu de Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase ou d'UDPGal-4-épimérase.

Par contre, de tels mutants existent chez d'autres organismes :

1) *chez l'homme*. — KALCKAR et coll. (1956) ont montré que la galactosémie, maladie humaine héréditaire, est causée par l'absence de l'enzyme Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase. Le déterminisme génétique de cette maladie est encore mal connu, mais les travaux de KIRKMAN et BYNUM (1959) concernant le dosage de l'enzyme chez les hétérozygotes, aussi bien que le pedigree des familles comprenant des galactosémiques, semblent indiquer que la mutation d'un seul gène est à l'origine de la maladie.

2) *chez E. coli*. — MORSE, LEDERBERG et LEDERBERG (1956) ont isolé une série de mutants de *E. coli* K₁₂, galactose-négatifs, se répartissant en deux différents « cistrons ». L'analyse enzymatique de ces mutants, effectuée par KURAHASHI (1957) a montré que l'un des cistrons concerne la galactokinase, tandis que l'autre concerne la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase.

D'autres mutants, génétiquement plus complexes, isolés par LEDERBERG (1958) et analysés par KALCKAR et coll. (1959) sont déficitaires en UDPGal-4-épimérase, de même que des mutants obtenus indépendamment par FUKASAWA et NIKAIDO (1959).

5.5. RÉSUMÉ

1) Les souches étudiées qui portent l'allèle récessif g_1 ne synthétisent pas la galactokinase (mesurée par son activité après induction). Cependant, les autres enzymes du métabolisme du galactose sont induites dans ces conditions. On peut donc en conclure que le gène G_1 contrôle, spécifiquement, la biosynthèse de la galactokinase.

2) Les souches portant l'allèle G_2 concentrent le galactose après induction. Au contraire, la souche portant l'allèle g_2 conserve, même après induction, une perméabilité faible envers le galactose (du même ordre de grandeur que celle des cellules non-induites). On peut donc en conclure que le gène G_2 contrôle la biosynthèse induite d'un système de transport actif du galactose chez *S. cerevisiae*. Ce système a été assimilé à une « galactose-perméase ».

3) Quelques propriétés de la galactose-perméase ont été étudiées :

a) La vitesse de concentration du galactose radioactif, chez la souche de géno-

type $g_1G_2G_3$ varie avec la concentration extérieure du galactose. A 28° , elle passe de 1 μ mole à 300 μ moles par minute et par g de poids sec, pour des concentrations en galactose de 10^{-3} M et 10^{-1} M, respectivement.

b) La vitesse initiale (estimée par extrapolation) de pénétration du galactose est de 590 μ moles par minute et par g de poids sec, pour une concentration de galactose 10^{-1} M.

c) La vitesse maximum (extrapolée) est environ 1 mmole par minute et par g de poids sec.

d) La concentration intracellulaire (apparente) atteinte après 10 minutes, varie avec la concentration extérieure : la souche de génotype $g_1G_2G_3$ concentre environ 7 à 8 fois lorsque la concentration extérieure varie entre 10^{-3} et 10^{-1} M.

e) La concentration intracellulaire maximum (déduite par extrapolation) est de l'ordre de 4 M. pour la souche de génotype $g_1G_2G_3$.

f) La vitesse de concentration varie avec la température. Son maximum se situe aux environs de 37° . Le Q_{10} de cette variation est situé entre 3 et 4 pour les souches induites de génotypes $g_1G_2G_3$ et $G_1g_2G_3$, et est de l'ordre de 0,5 pour toutes les souches non induites. Les Q_{10} obtenus montrent que :

— La réaction catalysée par la galactose-perméase est probablement de nature enzymatique.

— La perméabilité des cellules non-induites n'est probablement pas de nature enzymatique.

— Il est également probable que la faible activité présente dans la souche de génotype $G_1g_2G_3$ (de l'ordre de 15 p. 100 de l'activité galactose-perméasique) est de nature enzymatique.

g) Le glucose inhibe la pénétration du galactose. A concentrations équimoléculaires de glucose et de galactose, la perméabilité envers le galactose (mesurée par la vitesse d'entrée) est inhibée de 57 p. 100. Ce phénomène a été discuté comme l'une des interprétations possibles du phénomène d'attaque préférentielle.

h) Le produit concentré par la souche de génotype $g_1G_2G_3$, c'est-à-dire sous l'effet de la galactose-perméase seule, (en absence de tout métabolisme du galactose), présente des propriétés chromatographiques identiques à celles du galactose libre.

i) Le produit concentré par la souche CH-1, métabolisant le galactose semble par ses propriétés (R_f , absence de pouvoir réducteur, réaction positive au nitrate d'argent, libération après hydrolyse d'un seul sucre réducteur de même R_f que le glucose), pouvoir être identifié au tréhalose. Les rôles que l'on peut attribuer à l'incorporation des sucres libres dans le pool de tréhalose intracellulaire ont été discutés.

j) La souche de génotype $g_1G_2G_3$, induite, présente une perméabilité envers le galactose du même ordre de grandeur que la souche CH-1. Il semble donc exclu que le gène G_3 puisse être en rapport avec l'activité galactose-perméasique finale des souches de ce génotype, mais il reste possible que ce gène contrôle le mode d'induction de la galactose-perméase.

4) L'existence de gènes contrôlant la biosynthèse des autres enzymes du métabolisme du galactose (Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, et UDPGal-4-épimérase) chez *E. coli* et chez l'homme a été brièvement mentionnée.

VI. — BIOSYNTHÈSE INDUITE DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE

Les recherches concernant le caractère inductible de la « galactozymase » seront résumées au cours de l'introduction et intégrées dans l'ensemble des connaissances acquises dans le domaine de l'adaptation enzymatique.

La galactozymase ayant été jusqu'à présent considérée comme un tout, il était intéressant d'étudier séparément la biosynthèse induite de chacune des enzymes impliquées.

Les expériences qui seront présentées au cours de ce chapitre permettent d'établir le caractère inductible de chacune de ces enzymes, d'étudier comparativement la cinétique et la spécificité de leur induction.

L'utilisation de souches mutantes permettra de montrer que le galactose se comporte comme un inducteur polyvalent provoquant la formation simultanée des enzymes du métabolisme du galactose.

Un certain nombre de paramètres influant sur l'adaptation au galactose seront étudiés. Il sera montré que l'addition d'une source d'énergie exogène, sous forme de petites quantités de glucose, permet de réduire la durée de la phase de latence et d'accélérer, dans certaines conditions, la vitesse de l'adaptation.

Mettant à profit l'exigence pour le tryptophane de la souche CH-1, il sera montré que la limitation en tryptophane exogène, au cours de l'adaptation, modifie de façon similaire les vitesses de biosynthèse des enzymes de deux systèmes inductibles différents : enzymes de la respiration terminale et enzymes du métabolisme du galactose.

De plus, la teneur en enzymes du métabolisme du galactose sera étudiée, en rapport avec le mode de culture et l'induction.

La signification de l'ensemble des résultats obtenus, concernant le mécanisme de l'induction et des régulations métaboliques internes (répressions), sera discutée.

6.1 INTRODUCTION.

Le phénomène de « l'adaptation enzymatique » a fait l'objet de très nombreux travaux. D'excellentes revues en ont dégagé les résultats essentiels et les hypothèses qui ont été successivement avancées pour expliquer ce phénomène ont été discutées d'une manière détaillée (cf. MONOD et COHN, 1952 ; POLLOCK, 1953 ; MONOD, 1955 et 1956 ; VOGEL, 1957 ; POLLOCK, 1959).

Les acquisitions les plus récentes ont permis d'apporter des bases solides à une théorie unifiée des mécanismes biochimiques et génétiques assurant le contrôle de la biosynthèse des protéines.

Bien que l'étude de la galactozymase ait été à l'origine des travaux concernant l'adaptation enzymatique, ce sont d'autres systèmes — β -galactosidase de *E. coli* (cf. MONOD, 1955), pénicillinase de *B. cereus* (cf. POLLOCK, 1959), et la formation des enzymes de la respiration terminale chez la levure (cf. SLONIMSKI, 1956) — qui ont fait l'objet des études les plus approfondies.

Au cours de cette introduction, je résumerai tout d'abord de façon succincte les principaux faits établis dans le domaine de l'adaptation enzymatique.

J'examinerai également l'état de nos connaissances en ce qui concerne la formation adaptative du système « galactozymase » chez la levure, système qui sera étudié plus en détail au cours de la partie expérimentale de ce chapitre.

Adaptation enzymatique. — Généralités.

Au sein d'une population de cellules d'un génotype défini, l'apparition d'une capacité enzymatique nouvelle peut être due à deux phénomènes essentiellement différents :

1) Toutes les cellules de la population sont génétiquement capables de former l'enzyme nouvelle, mais cette formation requiert la présence d'une substance spécifique, « l'inducteur ». Si nous prenons comme exemple une adaptation à l'utilisation d'un substrat, le génotype de la population demeurera inchangé, même après croissance aux dépens de ce métabolite. Ce phénomène est communément appelé « *adaptation enzymatique* ».

2) Toutes les cellules sont génétiquement incapables de former l'enzyme nouvelle, mais seule une mutation confère à certaines d'entre elles la capacité de la former et de se multiplier aux dépens du métabolite considéré. L'utilisation de ce dernier résultera donc de la sélection du génotype mutant.

a) Si la capacité de former l'enzyme peut s'exprimer en absence de l'inducteur, la croissance de la population sera le résultat de la superposition de deux phénomènes : *mutation*, suivie de *sélection*.

b) Si l'apparition de l'enzyme requiert la présence de l'inducteur, le phénomène de l'adaptation enzymatique s'ajoutera aux deux précédents. La croissance sera alors le résultat de : *mutation* — *adaptation enzymatique* — *sélection*.

Le phénomène d'adaptation enzymatique peut donc être défini par les critères suivants : nécessité de la présence d'un inducteur, absence de modification du génotype après adaptation.

On voit que le phénomène d'adaptation enzymatique conduit à classer les enzymes en deux catégories apparemment distinctes :

—a) *Les enzymes adaptatives*. — Elles apparaissent après addition d'une substance chimique définie et spécifique appelée « inducteur » ;

—b) *les enzymes constitutives*. — Leur présence ne dépend pas de l'action d'un inducteur exogène.

Cette distinction, basée sur les faits expérimentaux, conduit à formuler trois hypothèses :

—1) Les enzymes constitutives et les enzymes adaptatives sont deux catégories différentes de protéines, en ce qui concerne leur mode de biosynthèse ;

—2) toutes les enzymes sont de nature adaptative, mais certaines apparaissent constitutives à cause de la présence d'un inducteur endogène ;

—3) toutes les enzymes sont de nature constitutive, mais certaines apparaissent adaptatives, à cause de la présence d'une substance qui en inhibe l'activité ou la synthèse et dont l'effet est spécifiquement neutralisé par l'inducteur. Cette substance est appelée « répresseur ».

En ce qui concerne la première hypothèse, il a pu être montré que dans les deux cas où les enzymes ont pu être obtenues dans un état de pureté suffisant (β -galactosidase, COHN et TORRIANI, 1953, pénicillinase, POLLOCK, 1956), l'enzyme formée après induction et l'enzyme formée constitutivement par des mutants homologues,

sont identiques, par l'ensemble des propriétés chimiques, physiques et immunologiques étudiées.

Jusqu'en 1958, la seconde hypothèse était la plus couramment admise. Toutefois, l'existence d'un inducteur endogène n'a jamais pu être démontrée.

Une expérience de PARDEE, JACOB et MONOD (1958) devait faire passer au premier plan la troisième hypothèse. En effet, les résultats des croisements réciproques en absence d'inducteur, de deux souches de *E. coli* de génotype i^+z^+ et i^-z^- ⁽¹⁾ ont conduit à admettre que la présence du gène i^+ provoque l'accumulation d'une substance appelée « répresseur », capable d'antagoniser l'action du gène z . Les mutants constitutifs, portant l'allèle i^- (récessif) ne seraient donc plus des mutants contenant un inducteur endogène, mais des mutants ayant perdu la capacité de former un répresseur actif.

De nombreux systèmes enzymatiques répondent à ce schéma (*cf.* MAGASANIK, et coll. 1959, pour revue).

Il a été montré depuis longtemps que l'une des caractéristiques principales de l'induction réside dans la spécificité de l'inducteur. Toutefois, la propriété d'être un inducteur n'est pas liée à la capacité d'être un substrat de l'enzyme induite (MONOD et coll., 1951 ; voir aussi MONOD, 1955).

Un inducteur exogène des enzymes d'une chaîne de biosynthèse est, soit le premier substrat de cette chaîne, soit une substance possédant une analogie structurale étroite avec le substrat. Un répresseur exogène est apparemment le produit final d'une chaîne de biosynthèse. Certains analogues structuraux peuvent également en reproduire les effets (COHEN et JACOB, 1959). Toutefois, la nature du répresseur endogène, probablement plus complexe, n'a pas encore été déterminée.

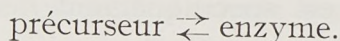
Le rôle de l'inducteur semble être d'ordre catalytique, puisque, dans le cas de la pénicilline, POLLOCK a pu montrer qu'une cellule de *B. cereus* peut former 30 à 40 molécules de pénicillinase par heure et par molécule de pénicilline fixée (*cf.* POLLOCK et PERRET, 1951).

Il ressort de ce qui précède que par le jeu de substances spécifiques, inducteurs et répresseurs, l'activité métabolique d'une cellule peut être modifiée, en réponse à des variations du milieu intérieur ou du milieu extérieur. Un tel contrôle, peut à priori, s'exercer de plusieurs façons :

- A) Transformation d'un précurseur de l'enzyme.
- B) Remaniement d'une structure protéique préexistante.
- C) Levée d'une répression ou induction de la synthèse d'une protéine spécifique.

Mécanisme A :

L'hypothèse de YUDKIN (1938) attribuait à l'inducteur-substrat le rôle d'un complexant de l'enzyme, accélérant la transformation d'un précurseur protéique inactif en enzyme active par le déplacement de la réaction d'équilibre :



⁽¹⁾ On connaissait depuis longtemps l'existence, chez *E. coli*, de mutants constitutifs pour la β -galactosidase (LEDERBERG, 1951). L'étude génétique de ces mutants a montré que le caractère Inductibilité/Constitutivité, est placé sous le contrôle d'un couple d'allèles i^+/i^- , tandis que la capacité de former l'enzyme est placée sous le contrôle d'un gène distinct z^+z^- (COHEN-BAZIRE et JOLIT, 1953 ; voir aussi PARDEE, JACOB et MONOD, 1959).

Mécanisme B :

La présence de l'inducteur peut avoir pour effet de provoquer une modification de structure d'une protéine préexistante. Tel semble être le cas de la lactico-déshydrogénase de la levure. En effet, la présence de plusieurs analogues d'acides aminés n'inhibe pas l'apparition, en aérobiose, de l'enzyme à spécificité L-lactique, dans des conditions où la formation de plusieurs autres enzymes respiratoires est inhibée (*cf.* mécanisme C), et cette apparition est compensée par une diminution corrélative de l'enzyme anaérobie à spécificité D-lactique (KATTERMAN et SLONIMSKI, 1960). Des études physico-chimiques ont montré que les propriétés du site actif des deux enzymes sont différentes (*cf.* SLONIMSKI et TYSAROWSKI, 1958).

Mécanisme C.

L'absence d'un seul acide aminé (MONOD et coll., 1952), ou son remplacement par un analogue structural (HALVORSON et SPIEGELMAN, 1952) permettent de bloquer la biosynthèse des enzymes étudiées, β -galactosidase et maltozymase. De plus, les expériences isotopiques ont montré que, dans des conditions déterminées, la β -galactosidase est synthétisée à partir des acides aminés présents pendant l'induction, sans aucune participation des molécules plus complexes présentes dans la cellule au début de l'induction (COHN et MONOD, 1953 ; HOGNESS et coll., 1955). Il a été conclu de ces expériences que l'inducteur a pour effet de permettre la biosynthèse *de novo* d'une enzyme dont la formation était préalablement empêchée.

On pourrait penser que la non-formation de l'enzyme, en absence d'inducteur, était due à la présence d'un « répresseur » spécifique. Une telle explication est corroborée par l'ensemble des observations plus récentes qui ont montré que : 1) la présence de concentrations élevées de produits terminaux (arginine, tryptophane, par exemple) inhibe la synthèse des enzymes conduisant à leur formation ; 2) certaines enzymes, dites constitutives, sont synthétisées en quantités très supérieures à la normale lorsque la concentration endogène du produit de la réaction se trouve abaissée. Ce phénomène est appelé « dé-répression » (GORINI et MASS, 1957 ; voir aussi MAGASANIK et coll. 1959, et COHEN et JACOB, 1959).

Il est possible que ce phénomène de *répression enzymatique* puisse s'appliquer à l'ensemble de l'équipement enzymatique cellulaire.

Ces trois mécanismes s'accordent avec la définition de l'adaptation enzymatique telle qu'elle a été formulée au début de cette introduction : apparition d'une activité enzymatique nouvelle, sous l'influence d'un inducteur spécifique. Toutefois, seul un mécanisme de type C s'accompagne d'une synthèse *de novo* de l'enzyme : *Bio-synthèse induite*.

Ce dernier terme ne pourra être employé que lorsqu'il aura été montré que l'apparition de l'activité enzymatique nouvelle satisfait aux critères suivants : 1) présence d'une source d'énergie métabolisable, nécessaire à toute synthèse protéique ; 2) présence de tous les acides aminés indispensables.

Le fait que des protéines spécifiques sont synthétisées *de novo*, à partir des acides aminés, a conduit à imaginer un mécanisme permettant d'assurer, en une seule étape, l'arrangement structural spécifique des acides aminés de chaque espèce protéique. De nombreux schémas ont été proposés, reposant tous sur l'existence hypothétique d'un « template » ou « matrice », médiateur de l'information génique :

La découverte récente de l'existence de « gènes opérateurs », contrôlant, en combinaison avec le système de répression, l'activité des « gènes structuraux », directement responsables de la synthèse des protéines (JACOB et MONOD, 1959), permettra sans doute d'apporter des données nouvelles concernant les mécanismes qui président à la biosynthèse des protéines spécifiques.

Formation adaptative de la « galactozymase » chez la levure.

1) *Adaptation enzymatique.* — La première observation concernant la nécessité d'une adaptation préalable au galactose, pour que les levures puissent utiliser ce sucre, a été faite par DIENERT en 1900. Dès 1910 HARDEN et NORRIS montrèrent que la « galactozymase » (alors considérée comme une seule enzyme dont le rôle était d'assurer la fermentation du galactose) ne pouvait être mise en évidence que chez les levures préalablement « adaptées » au galactose. EULER et JANSSON (1927) excluaient la possibilité que la modification enzymatique soit due à une modification de la partie coenzymatique et rendaient donc probable l'interprétation selon laquelle la formation de l'apoenzyme était la cause de l'adaptation des levures à l'utilisation du galactose.

Au cours de ces expériences, la période de contact avec le galactose (jours et mêmes semaines), ou les milieux employés, ne permettaient pas d'éliminer la sélection, en tant qu'interprétation possible du phénomène d'adaptation au galactose.

C'est à STEPHENSON et YUDKIN (1936) que revient le mérite d'avoir montré que l'adaptation des levures au galactose est possible dans des conditions où le nombre des cellules vivantes n'augmente pas. De plus, ces auteurs confirmèrent les observations de DIENERT concernant la « désadaptation », c'est-à-dire la disparition progressive de la galactozymase, lorsque les cellules adaptées sont remises à proliférer sur un milieu contenant du glucose comme seule source de carbone. Les levures ainsi désadaptées sont capables de s'adapter à nouveau, en présence de galactose. L'adaptation des levures au galactose est donc accomplie sans modification des propriétés initiales de la population, répondant ainsi aux critères d'une « adaptation enzymatique ».

2) *Biosynthèse induite.* — L'hypothèse que formulait YUDKIN (1938) reposait sur le déplacement par le substrat d'une réaction d'équilibre entre un précurseur protéique et l'enzyme active. Toutefois, les expériences précédemment mentionnées ne permettaient pas de distinguer entre cette hypothèse et l'hypothèse d'une synthèse complète, *de novo* de l'enzyme.

a) *Nécessité d'une source d'énergie métabolisable.* — STEPHENSON et YUDKIN, (1936), SPIEGELMAN (1945) avaient montré que la formation induite de la galactozymase chez la levure peut avoir lieu, en aérobiose, sans apport d'énergie exogène. Il est toutefois bien connu que les levures possèdent d'importantes réserves endogènes, utilisables en aérobiose, mais non-fermentescibles (*cf.* TREVELYAN, 1958, pour revue).

Si l'adaptation au galactose est le résultat d'une biosynthèse induite de tout ou partie de la galactozymase, on doit donc s'attendre à ce que l'adaptation en anaérobiose dépende de l'addition d'une source d'énergie exogène ⁽¹⁾.

(1) *E. coli* qui ne possède pas de réserves hydrocarbonées importantes, requiert, en présence d'un inducteur non métabolisable, une source exogène d'énergie pour former la β -galactosidase (MONOD et COHN, 1952).
SLONIMSKI (1956) a étudié quantitativement l'énergétique de la formation adaptative des enzymes respiratoires chez la levure et a pu montrer que la vitesse d'adaptation est, dans les conditions choisies, directement proportionnelle au débit énergétique.

Les résultats de REINER et SPIEGELMAN (1947), montrant une formation induite de la galactozymase, en anaérobiose, sans autre apport carboné que le galactose utilisé comme inducteur, étaient donc en contradiction apparente avec cette hypothèse. Cependant, LINDENGREN et PALLERONI (1952) montrèrent que ces résultats étaient dus à la présence de glucose dans le galactose utilisé par ces auteurs. Après une purification plus poussée de ce sucre, la plupart des souches essayées se sont révélées incapables de s'adapter anaérobiquement, dans les conditions précédemment utilisées. Toutefois, si l'adaptation au galactose est amorcée en aérobiose, c'est-à-dire en présence d'un métabolisme énergétique endogène, celle-ci peut ensuite se poursuivre en anaérobiose, la galactozymase déjà formée étant alors capable de fournir l'énergie nécessaire (SPIEGELMAN, 1945).

On peut donc admettre que, d'une manière générale, la formation adaptative de la galactozymase, chez la levure, requiert la participation d'une source d'énergie métabolisable, endogène, ou à défaut, exogène.

b) *Nécessité d'une source d'azote assimilable.* — Il a déjà été signalé que la formation de la galactozymase, chez la levure, peut avoir lieu en absence d'une source d'azote exogène (STEPHENSON et YUDKIN, 1936). Au contraire, la biosynthèse de la β -galactosidase, chez *E. coli*, requiert, soit la présence d'une source d'azote exogène (MONOD et COHN, 1952), soit la présence d'un « turn-over » protéique (MANDELSTAM, 1957). Si des mutants auxotrophes sont utilisés, l'acide aminé indispensable à la croissance est également indispensable à la formation de la β -galactosidase (MONOD et coll., 1952).

Puisque la levure possède un pool important d'acides aminés, alors que celui de *E. coli* est comparativement très restreint (TAYLOR, 1947), on pouvait penser que la biosynthèse des enzymes inductibles pouvait s'effectuer chez la levure, à partir des acides aminés du pool. La participation de ce pool à la formation adaptative de la maltozymase, chez la levure, fut mise en évidence par HALVORSON et SPIEGELMAN (1952), grâce à l'utilisation d'analogues des acides aminés. Ces expériences n'avaient toutefois pas été répétées en ce qui concerne la formation adaptative de la galactozymase.

Il a pu être montré depuis, que l'absence d'un acide aminé essentiel à la croissance d'un mutant auxotrophe de *S. cerevisiae* réduit considérablement la vitesse d'adaptation au galactose, et que celle-ci augmente en fonction de la concentration exogène de cet acide aminé (de ROBICHON-SZULMAJSTER et SOMLO, 1959) ⁽¹⁾.

Il semble donc que ces résultats, nécessité d'une source d'énergie métabolisable et nécessité d'une source d'azote assimilable, permettent de considérer la formation adaptative de la galactozymase, chez la levure, comme une « biosynthèse induite » (cf. 6.1).

Au cours des travaux concernant l'adaptation des levures au galactose, mentionnés jusqu'ici, la galactozymase avait toujours été considérée comme un tout. Seuls les travaux biochimiques récents qui ont été exposés au cours des précédents chapitres, ont permis de connaître la nature complexe de ce système enzymatique, et ont rendu possible, le dosage spécifique de chacune des enzymes impliquées.

Il a donc semblé intéressant d'aborder l'étude de l'adaptation des levures au galactose au niveau enzymatique, et d'essayer de définir, de façon plus précise, les caractéristiques essentielles de ce système inductible.

(1) Ces expériences seront exposées en détail au cours de la partie expérimentale de ce chapitre.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

6.2 MISE EN ÉVIDENCE DU CARACTÈRE ADAPTATIF
DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE :
COMPARAISON ENTRE *S. CEREVISIAE* ET *S. FRAGILIS*.

Le caractère inductible des enzymes du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae* ressort des résultats qui ont été présentés au cours des chapitres précédents. On a vu, en effet, que la galactose-perméase, la galactokinase, la Gal-1-P/

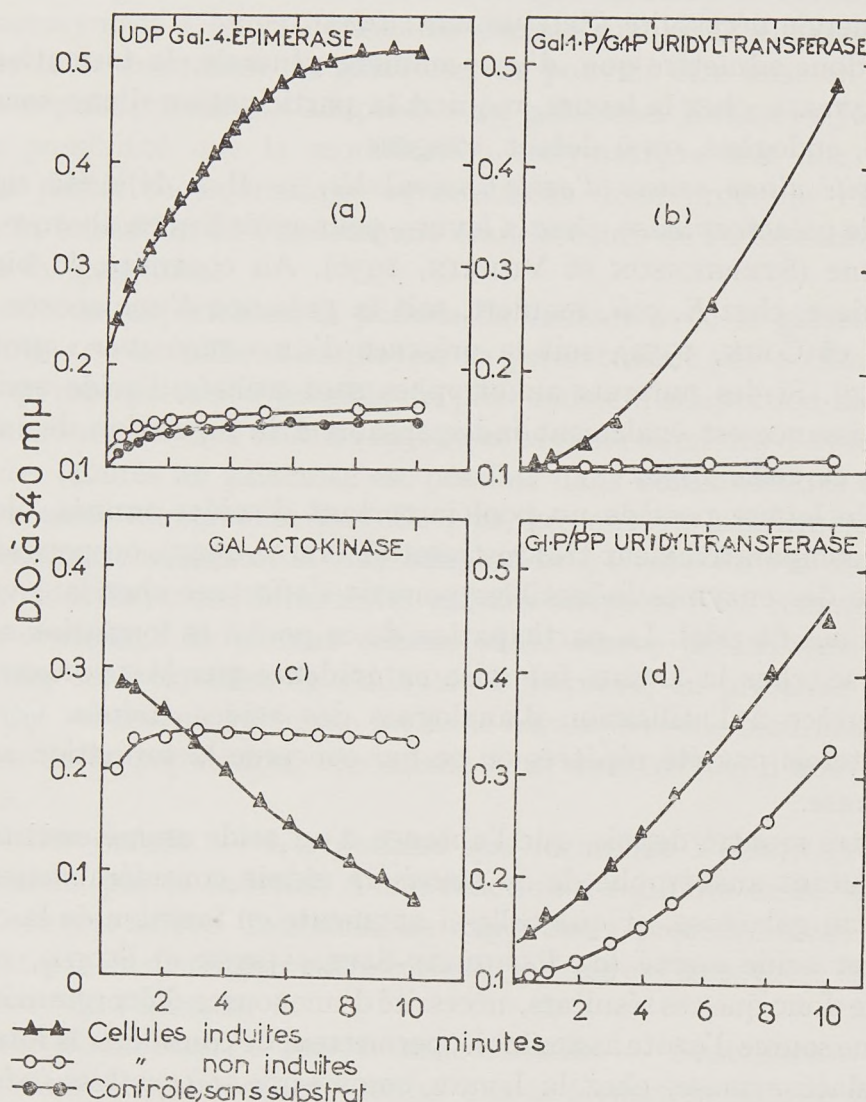


FIG. 36. — Dosage des enzymes du métabolisme du galactose chez *Saccharomyces fragilis*, induit et non-induit. Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

G-1-P uridyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase, sont absentes des cellules non-induites, tandis que les cellules ayant effectué leur croissance en présence de galactose possèdent ces quatre enzymes (sauf dans le cas où le gène responsable de leur biosynthèse est présent sous la forme de l'allèle récessif).

Par ailleurs, MILLS, SMITH et LOCHHEAD (1957) trouvèrent une activité UDPGal-4-épimérasique dans des broyats de *S. fragilis* (National Collection of Yeast Cul-

ture N°100) effectués après culture en absence de galactose, d'où ils conclurent au caractère constitutif de cette enzyme chez la levure.

C'est pourquoi j'ai effectué certaines expériences à l'aide d'une souche de *S. fragilis* (provenant de l'« American Type Culture Collection »). La figure 36 donne un exemple des cinétiques obtenues pour le dosage des différentes enzymes dans les cellules adaptées ou non-adaptées. On voit que les trois enzymes métabolisant le galactose, y compris l'UDPGal-4-épimérase (1, 2, et 3 de la figure 36), ne sont présentes que dans les extraits de cellules induites. Au contraire, la G-1-P/PP uridylyl-transférase est, de même que chez *S. cerevisiae*, présente dans les cellules non-induites, aussi bien que dans les cellules induites (de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1958a).

Cette souche de *S. fragilis* se comporte donc d'une façon tout à fait comparable à *S. cerevisiae*. Le désaccord entre ces résultats et ceux des précédents auteurs n'a pu être expliqué.

6.3 ÉTUDE DE L'INDUCTION DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE

A) Concentrations inductrices

Au cours d'une série d'expériences j'ai cherché à définir quelles sont, pour les souches 1235/2b (génotype $g_1G_2G_3$) et 1238/5d (génotype $G_1g_2G_3$), les concentrations de galactose capables d'induire les différentes enzymes assurant son métabolisme. La souche de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ galactose-positive, n'a pas été étudiée ici en raison de sa capacité d'utiliser le galactose après induction. En effet, une concentration constante en galactose ne pourrait être maintenue qu'à l'aide d'un « thermostat ».

TABLEAU 16

Incorporation du ^{14}C -galactose dans la fraction nucléotidique

10^{-3} μ moles de galactose incorporé par mg de protéine et par heure.

Moyenne de deux expériences.

Après croissance sur milieu naturel 3S-glucose, incubation en présence de galactose (selon les concentrations indiquées) ; tampon phosphate, pH 6,5, 0,1 M et tryptophane 10 μ g/ml, pendant 8 heures, 28°, agitation.

Les cellules sont ensuite centrifugées, lavées, et les extraits effectués selon la méthode habituelle (cf. 3.7).

Incubation : 60 minutes à 37°, en présence de :

— Galactose ^{12}C + ^{14}C : 1 μ mole

— ATP : 1,7 μ moles ; $MgCl_2$: 5 μ moles ; UDPG : 0,5 μ moles ; FNa : 25 μ moles ; cystéine neutralisée : environ 30 μ moles.

— Tampon Tris, pH 7,0, concentration finale 0,1M.

— Enzymes (ajoutées comme indiqué) : quantité équivalente à 1 mg de protéine des préparations purifiées.

— Eau distillée : complément à 1 ml.

Dosages effectués selon la technique habituelle (voir 3.10).

Galactose (mg/ml) pendant l'adaptation	Extraits seuls		Extraits + Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase		Extraits + Galactokinase	
	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$
0	0	0	0	0	0	0
0,1	—	0,2	—	0	—	0
1,0	0	6	0	8	8,5	33,5
10	0	12,5	0	11,0	90,0	40,0

Quatre concentrations initiales de galactose ont été essayées : 0,01, 0,1, 1 et 10 mg/ml, pour une période unique d'incubation arbitrairement fixée à 8 heures.

Le tableau 16 résume les résultats obtenus en mesurant l'incorporation du ^{14}C -galactose dans les nucléotides uridyliques. Rappelons qu'une incorporation n'est possible qu'à la condition que les deux enzymes, galactokinase et Gal-1-P/G-1-P-uridyltransférase, soient présentes.

On voit, comme cela a déjà été montré au cours du chapitre précédent, qu'il n'y a incorporation, pour les extraits de la souche galactokinase-négative (génotype $g_1G_2G_3$) que lorsqu'on ajoute la galactokinase au mélange d'incubation. L'induction est nettement positive (au moins 50 p. 100 de la valeur maximum) pour la concentration de 1 mg/ml.

Les résultats reproduits dans le tableau 17 donnent les activités des trois enzymes mesurées séparément, après induction dans des conditions peu différentes des conditions précédentes (voir légende du tableau 16.)

TABLEAU 17

*Induction des enzymes du métabolisme du galactose,
en présence de quantités variables de galactose*

10^{-4} μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine, rapporté à 1000 U. de G-1-P/PP uridyltransférase.

Culture sur milieu synthétique H_3T -glucosé, le glucose étant le facteur limitant. Lorsque la croissance s'arrête, on ajoute le galactose aux concentrations indiquées et on laisse incuber 8 heures, à 28°, avec agitation. Les levures sont ensuite centrifugées, lavées, et les extraits et dosages d'enzymes effectués de la manière habituelle (voir 3.10).

Galactose (mg/ml) pendant l'adaptation	Galactokinase		Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase		UDP Gal-4- épimérase	
	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$
0.....	0,01	0,03	0	0	0	0
0,01.....	0	—	0	—	0	—
0,1.....	0	2,7	37,7	14,5	16,8	3,0
1,0.....	0	57,7	710	649	92,5	89,0
10.....	0,02	55,1	780	554	—	49,8

On voit que la limite inférieure de l'induction est située entre 0,01 et 0,1 mg/ml, et se trouve être la même pour chacune des trois enzymes, dans les deux souches.

Lorsque l'incubation est faite en présence d'acétate procurant une source d'énergie additionnelle, on constate (tableau 18) que la concentration minimum ayant permis un début d'induction est alors 0,01 mg/ml pour la souche de génotype $g_1G_2G_3$. Toutefois, cette concentration est inefficace pour la souche de génotype $G_1g_2G_3$ qui, de même que dans les expériences précédentes, ne commence à être induite que pour la concentration 0,1 mg/ml.

Ces résultats correspondent à ce à quoi on aurait pu s'attendre étant donné le génotype des souches. En effet, la souche 1235/2b, possédant une galactose-perméase, est capable de concentrer environ 10 fois le galactose à partir du milieu extérieur (voir 5.3). La concentration intracellulaire requise pour induire les trois enzymes du

TABLEAU 18

*Induction des enzymes du métabolisme du galactose en présence d'acétate
et de quantités variables de galactose*

10^{-4} μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine, rapporté à 1000 U. de G-1-P/PP uridylyltransférase.

Adaptation en présence d'acétate (0,1 M, pH 6,0), de galactose (selon les concentrations indiquées) et de tryptophane (10 μ g/ml), pour une durée de 8 heures, à 28°, avec agitation. Extraits et dosages ont été effectués selon les techniques habituelles (voir 3.10).

Galactose (mg/ml) pendant l'adaptation	Galactokinase		Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase		UDPGal-4- épimérase	
	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$
0.....	0	0	0,1	0,4	0	0
0,01.....	0	0	46	0	31	0
0,1.....	0	32	144	91	89	27
1,0.....	0	113	716	417	196	170
10.....	0	129	986	384	237	164

métabolisme du galactose est donc celle qui est suffisante pour la souche 1238/5d qui ne concentre pas, c'est-à-dire 0,1 mg/ml ou 5×10^{-4} M.

Il est évident que cette valeur ne représente qu'un ordre de grandeur, valable seulement pour les conditions expérimentales employées.

B) Spécificité de l'inducteur

Une série de sucres, présentant des analogies de structure avec le D-galactose, ont été essayés : L-galactose, D-arabinose, L-arabinose, L-fucose, D-lyxose, D-lactose, 2-désoxygalactose et le thiométhyl-galactoside (TMG). Dans les conditions expérimentales choisies (concentration 10 mg/ml, incubation de 8 heures dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5), tous ces composés ont donné des résultats négatifs pour les trois enzymes métaboliques. L'induction de la galactose-perméase n'a pas été recherchée au cours de ces expériences.

Le D-galactose semble donc être, jusqu'à présent, le seul composé capable d'induire la formation des enzymes assurant son métabolisme ⁽¹⁾.

6. 4 ÉTUDE DE LA PÉRIODE DE LATENCE PRÉCÉDANT L'ADAPTATION AU GALACTOSE

Comme le montre la figure 37, l'adaptation des levures au galactose peut être suivie, dans l'appareil de Warburg, par l'évolution de la capacité respiratoire vis-à-vis de ce sucre. L'adaptation aérobie des levures au galactose comporte trois phases : une période de latence, une période d'accroissement linéaire de la capacité d'oxyder le galactose, et un plateau.

On voit que la respiration endogène, relativement élevée au début ($QO_2 = 25$),

⁽¹⁾ Les substrats intermédiaires, galactose-1-phosphate et UDPGalactose, n'ont pas été essayés, puisqu'il semble très improbable, par analogie avec les faits connus concernant les esters phosphorylés du glucose, que ces produits puissent franchir la membrane cellulaire.

baisse rapidement pour atteindre, après la troisième heure une valeur constante ($QO_2 = 10$).

D'autre part, la respiration mesurée dans la cupule contenant du galactose est supérieure à la respiration endogène pendant les deux premières heures. Ceci est dû aux traces de glucose encore présentes dans le galactose employé, même après purification (voir 3.2). En se basant sur le dégagement de CO_2 obtenu en aérobiose avec des levures non-adaptées, cette impureté peut être estimée à $0,7 \mu\text{mole}$ par cupule (pour 20 mg de galactose), c'est-à-dire à $0,35 \mu\text{mole/ml}$ (cf. 3.2).

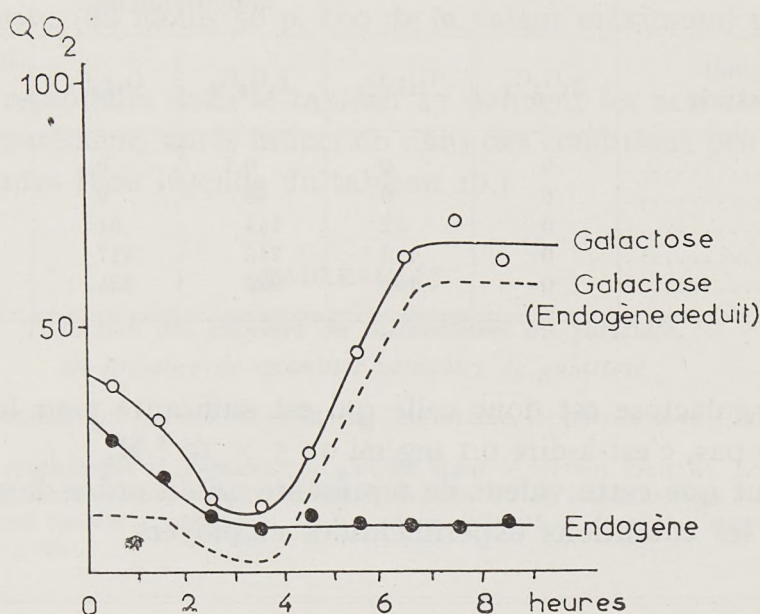


FIG. 37. — Cinétique de l'adaptation à la respiration en présence de galactose.
Saccharomyces cerevisiae : souche CH-1.

Tampon phosphate pH 6,0 0,1M ; galactose purifié à la concentration finale de 2 p. 100 ; cellules lavées 1,5 mg par cupule ; L-tryptophane à la concentration finale de $10 \mu\text{g/ml}$; 0,3 ml de KOH à 20 p. 100 dans le compartiment central ; volume total 2,3 ml.

Sauf mention spéciale, toutes les expériences d'adaptation utilisant la souche CH-1 ont été effectuées en présence de tryptophane à la concentration de $10 \mu\text{g/ml}$. En effet, il a déjà été indiqué que cette souche requiert le tryptophane pour sa croissance, et il sera montré plus loin qu'elle requiert aussi cet acide aminé pour former adaptativement les enzymes de la respiration terminale et les enzymes du métabolisme du galactose. Afin de rendre les courbes plus comparables d'une expérience à l'autre, les valeurs de la respiration endogène ont été déduites des valeurs obtenues en présence de galactose.

A) Durée de la période de latence.

La période de latence est de durée variable. Elle peut exceptionnellement être nulle, toutefois, elle se prolonge, le plus fréquemment entre deux et cinq heures.

L'examen des figures 40, 41 et 42 (voir plus loin), montre que cette période de latence est commune à toutes les enzymes du système, mais il est difficile de définir avec précision le moment où chacune de ces enzymes commence effectivement à être formée. Si l'on se reporte aux résultats de la figure 41 (souche CH-1), on peut voir

que, après 6 heures d'incubation, l'adaptation est nettement commencée, pour chacune des trois enzymes testées.

B) *Influence d'une source additionnelle d'énergie sur la durée du temps de latence.*

On sait que l'adaptation respiratoire sur glucose (induction par l'oxygène des enzymes de la respiration terminale) est précédée d'une phase de latence (SLONIMSKI, 1956). On vient de voir qu'il en est de même pour l'adaptation au galactose. Toutefois, cette phase de latence est toujours plus courte pour le premier système que pour le second. On peut se demander si cette différence n'est pas due au fait que le glucose continue à être fermenté au cours de l'adaptation respiratoire, procurant ainsi une source énergétique importante qui facilite le démarrage du processus d'adaptation.

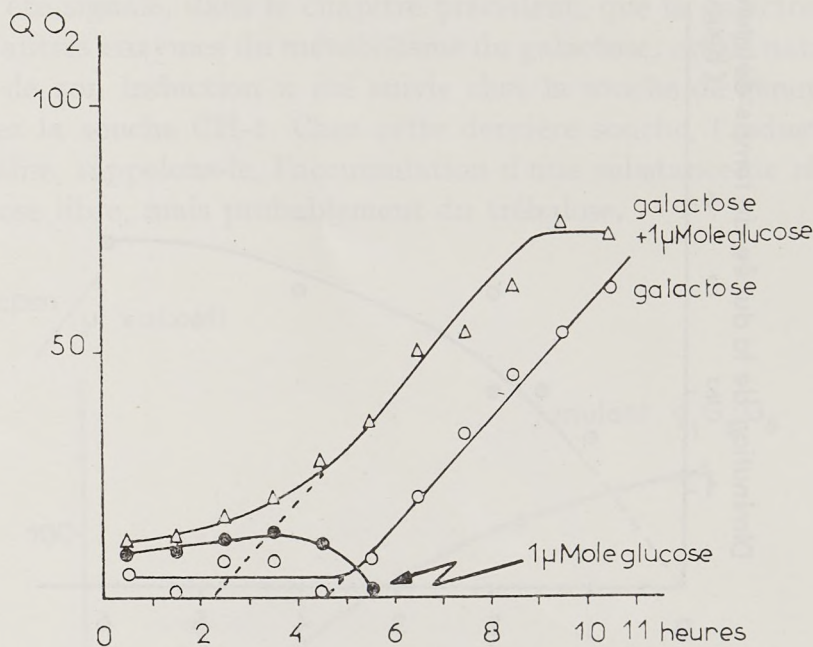


FIG. 38. — Adaptation au galactose de levures cultivées en aérobiose sur glucose ; influence de l'addition d'une petite quantité de glucose.
S. cerevisiae CH-1.

Respiration endogène déduite.
Conditions identiques à celles de la figure 37

Au contraire, le galactose ne peut être utilisé, que ce soit aérobiquement ou anaérobiquement, qu'après induction des enzymes assurant son métabolisme, comme cela a été démontré par l'ensemble des expériences exposées jusqu'à maintenant. Les cellules aérobies ne disposent donc, pour former les enzymes du métabolisme du galactose, que de l'apport énergétique de la respiration endogène. C'est pourquoi il a semblé intéressant de chercher quel pourrait être l'effet d'une source additionnelle d'énergie sur le début de l'adaptation au galactose.

Etant donné l'effet bien connu du glucose (MONOD, 1942) en tant qu'inhibiteur de l'adaptation enzymatique, il était exclu d'essayer l'effet de ce sucre à fortes concentrations. Toutefois, SLONIMSKI (1956) a montré que l'addition de petites quantités de glucose permettait d'obtenir une adaptation rapide des levures à la respiration de l'éthanol.

Comme le montre la figure 38, l'addition à des levures aérobies d'une quantité

de glucose aussi petite que 1 μ mole par ml et par 0,5 mg P. sec de cellules, permet déjà de raccourcir considérablement le temps de latence qui précède l'adaptation à l'utilisation du galactose. On voit que, dans cette expérience particulière, le temps de latence est passé de 4,5 h à 2 h. De plus, cette quantité de glucose est complètement consommée bien avant que l'adaptation au galactose soit terminée.

La réduction du temps de latence est d'autant plus grande que la quantité de glucose apportée est plus élevée (entre 1 et 6 μ moles), comme le montre la figure 39.

Il semble donc que l'un des facteurs déterminant la durée de la phase de latence soit la quantité d'énergie nécessaire pour les synthèses.

Cependant, d'autres observations montrent que le contrôle de la durée du temps de latence n'est probablement pas exclusivement d'ordre énergétique.

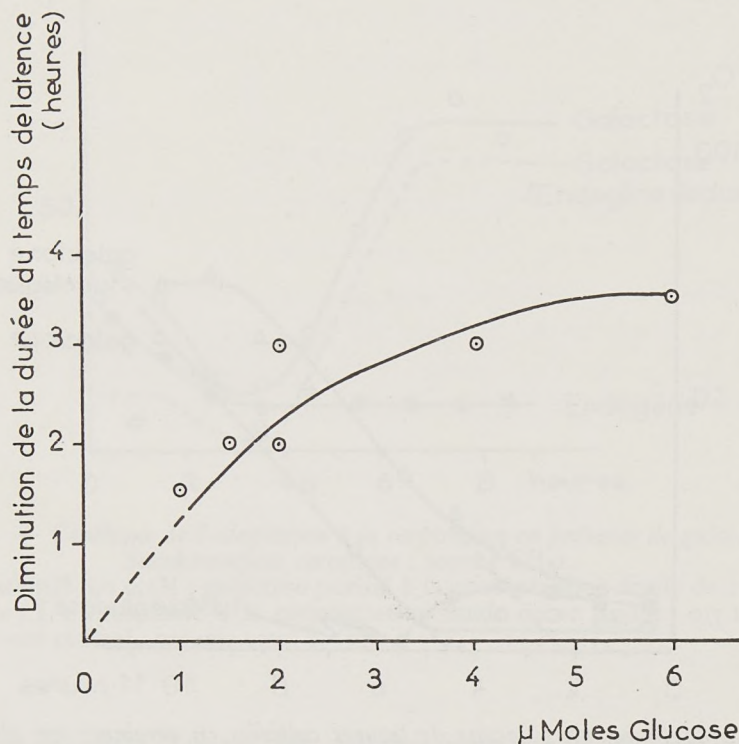


FIG. 39. — Effet de petites quantités de glucose sur la durée du temps de latence précédant l'adaptation aérobie au galactose.
S. cerevisiae, souche CH-1.

a) D'autres composés énergétiques, tels que le glycérol, le lactate et l'acétate, essayés à des concentrations variant entre 2 et 6 p. 100, se sont montrés tantôt sans action, tantôt inhibiteurs, bien qu'ils aient permis de maintenir pendant plusieurs heures des QO_2 de 30 à 40 ⁽¹⁾.

b) Si l'on prolonge jusqu'à l'axe des abscisses la partie des courbes correspondant à l'adaptation au galactose proprement dite, au cours de l'adaptation double (voir plus loin, figure 44), on voit que, si la durée de la phase de latence a été également diminuée, elle reste, même dans ces conditions, probablement supérieure à celle qui précède la formation induite des enzymes respiratoires.

⁽¹⁾ Les résultats qui ont été résumés dans le tableau 17 indiquent que l'acétate a permis, au cours de ces expériences, une meilleure adaptation au galactose (diminution, pour une souche, de la concentration capable d'induire). La cinétique de l'adaptation n'ayant pas été suivie au cours de ces expériences, il est impossible de dire quel paramètre de l'adaptation a été modifié par la présence de l'acétate.

c) Selon les conditions physiologiques des cellules (milieu de culture employé, moment de la croissance auquel est effectué le prélèvement, etc.) la respiration endogène varie considérablement : QO_2 de 0 à environ 40. Cependant, malgré le grand nombre d'expériences effectuées dans ce domaine, il ne semble pas possible d'établir une corrélation entre la durée du temps de latence et la présence des réserves endogènes respirables.

6.5 ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'ADAPTATION ET DE QUELQUES FACTEURS CAPABLES DE LA MODIFIER.

A) Cinétique d'induction de chaque enzyme.

Galactose-perméase.

Il a déjà été signalé, dans le chapitre précédent, que la galactose-perméase, de même que les autres enzymes du métabolisme du galactose, est de nature adaptative. La cinétique de son induction a été suivie chez la souche de génotype $g_1G_2G_3$, et également chez la souche CH-1. Chez cette dernière souche, l'induction des autres enzymes entraîne, rappelons-le, l'accumulation d'une substance de réserve qui n'est pas du galactose libre, mais probablement du tréhalose.

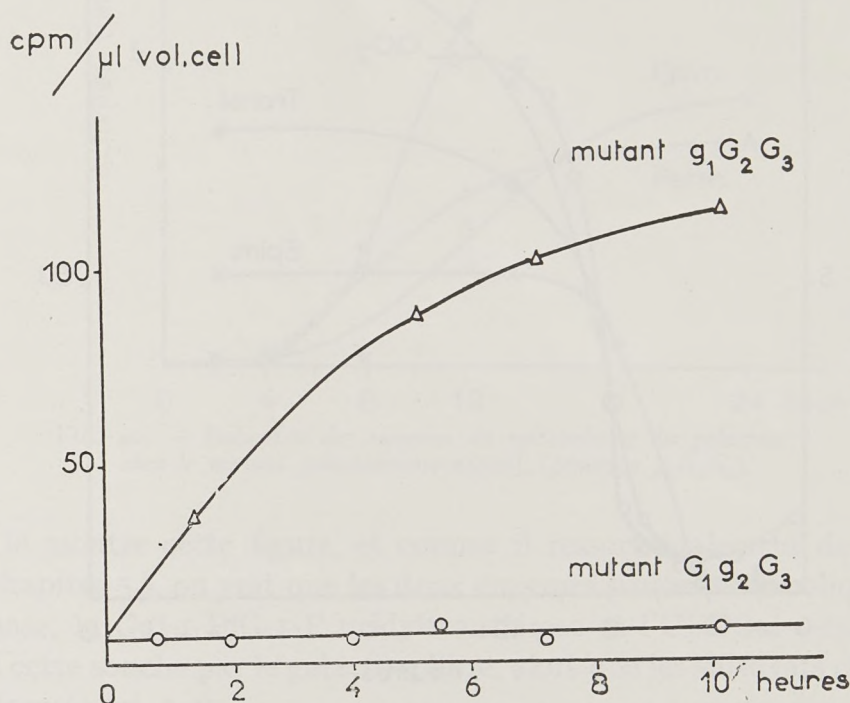


FIG. 40. — Variation de la capacité de concentrer le ^{14}C galactose en fonction de la durée du contact préalable des cellules avec le galactose non-radioactif. Souche galactokinase-négative ($g_1G_2G_3$) et galactose perméase-négative ($G_1g_2G_3$).

Pour l'induction, une seule concentration de galactose a été choisie, suffisante pour induire toutes les souches : 10 mg/ml. Au cours de l'incubation avec le galactose, des échantillons ont été prélevés, lavés avec soin, puis mis en contact avec du galactose radioactif selon la technique habituelle (voir 3.10).

Les résultats d'une expérience type sont représentés dans la figure 40. On voit que la perméabilité de la souche de génotype $G_1g_2G_3$ n'augmente pas au cours

du temps, et qu'elle demeure très faible (voir aussi 5.3). Au contraire, celle du mutant de génotype $g_1G_2G_3$ augmente rapidement pendant les premières heures de l'incubation, puis se stabilise. La perméabilité du diploïde augmente, pendant les premières heures, parallèlement à celle de la souche de génotype $g_1G_2G_3$, mais s'accélère ensuite, donnant à l'ensemble du phénomène l'aspect d'une courbe en S. Dans les deux cas, le plateau de l'induction se trouve atteint après 8 à 10 heures.

Dans l'expérience particulière, représentée dans la figure 40, il ne semble pas y avoir eu de temps de latence précédant l'induction. Toutefois, comme cela sera montré plus loin, il y a plus fréquemment une période de latence dont la durée est variable.

Enzymes du métabolisme du galactose.

1) *Induction chez la souche CH-1.* — Le dosage spécifique de la galactokinase se prête difficilement à une analyse en série. Aussi, seules les activités de la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et de l'UDPGal-4-épimérase ont-elles été suivies comparativement à la galactose-perméase.

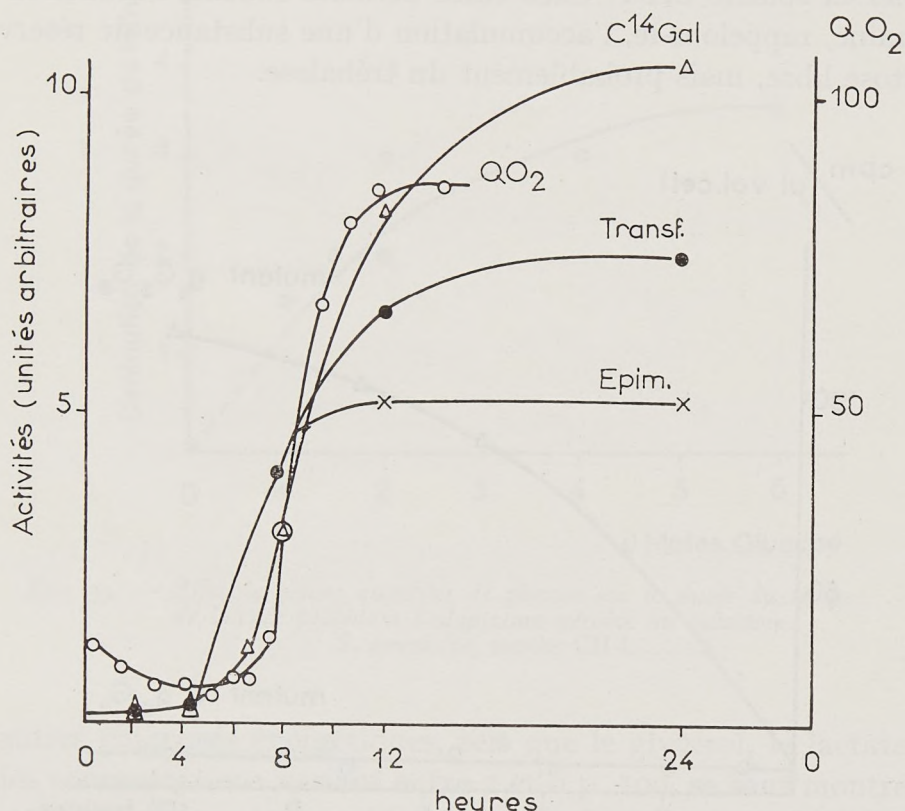


FIG. 41. — Induction des enzymes du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae* (génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$).
Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

La figure 41 résume l'une de ces expériences, effectuée à l'aide de la souche CH-1. On voit que les cinétiques (exprimées en unités arbitraires), ne sont pas très différentes. Malgré l'imprécision inhérente à ce genre d'analyse discontinue, il semble que le début de l'adaptation se situe au même moment pour ces trois enzymes. En tous cas, l'induction de la perméase ne semble pas précéder celle des enzymes métaboliques.

2) *Induction chez le mutant galactokinase-négatif.* — Selon le schéma désormais classique de STANIER (1947), l'induction d'une chaîne métabolique d'enzymes serait un phénomène séquentiel, le premier substrat induisant la première enzyme de cette chaîne ; le fonctionnement de celle-ci conduisant à la formation du substrat de la seconde, d'où l'induction de cette dernière, etc...

On aurait donc dû s'attendre, dans le cas du mutant galactokinase-négatif, à ne pas trouver les enzymes situées au-delà du bloc génétique, même après incubation avec le galactose.

La figure 42 représente les résultats d'une expérience effectuée à l'aide du mutant de génotype $g_1G_2G_3$, dans les mêmes conditions que pour la souche CH-I.

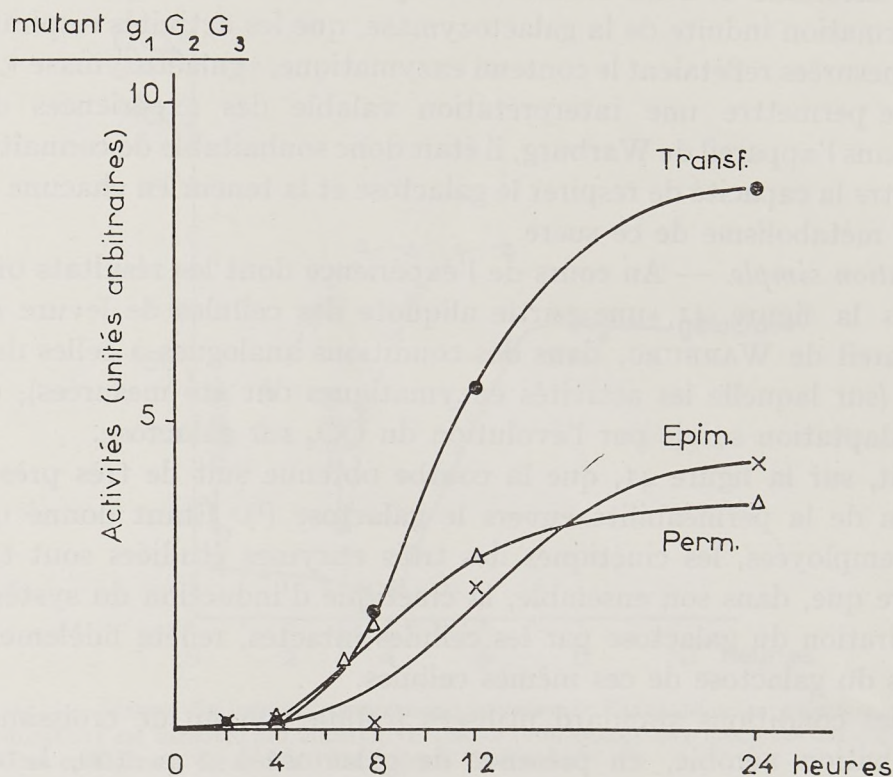


FIG. 42. — Induction des enzymes du métabolisme du galactose chez le mutant galactokinase-négatif, (génotype $g_1G_2G_3$).

Comme le montre cette figure, et comme il ressort également de l'examen du tableau 12 (chapitre 5.), on voit que les deux enzymes situées métaboliquement après la galactokinase, la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase, sont induites chez cette souche par le galactose libre, alors que les substrats de ces enzymes ne sont pas formés (cf. 5.2).

On voit que la cinétique d'induction de la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase est tout à fait comparable à celle de la même enzyme, dans la souche CH-I. Toutefois, l'UDPGal-4-épimérase est induite plus lentement que la transférase.

La signification de ce phénomène « d'induction simultanée » (H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957) sera discutée plus longuement à la fin de ce chapitre.

B) Corrélation entre le QO_2 -galactose et la teneur en enzymes :

Lorsque l'adaptation enzymatique est suivie par l'évolution de la capacité des cellules intactes à oxyder un substrat, le « taux d'adaptation » peut être défini comme

étant la « vitesse d'accroissement horaire du QO_2 », appelé AO_2 (cf. SLONIMSKI, 1956).

SLONIMSKI a montré, d'autre part, qu'il existe chez la levure, une corrélation satisfaisante entre l'évolution du QO_2 glucose au cours de l'adaptation respiratoire et le contenu en cytochrome-oxydase des broyats.

En ce qui concerne l'adaptation au galactose, SOHNGEN et COOLHAAS (1924) avaient mis en évidence le parallélisme existant entre la quantité de CO_2 dégagé par des cellules intactes, fermentant le galactose, et la teneur en galactozymase de ces mêmes cellules. Toutefois, la mesure de l'activité galactozymasique reposait également sur des techniques manométriques, la nature des réactions catalysées par la « galactozymase » étant alors inconnue. Il avait ensuite été implicitement admis par les auteurs ayant étudié la formation induite de la galactozymase, que les activités respiratoires ou fermentaires mesurées reflétaient le contenu enzymatique, « galactozymase », des cellules.

Afin de permettre une interprétation valable des expériences d'adaptation effectuées dans l'appareil de Warburg, il était donc souhaitable de connaître la relation existant entre la capacité de respirer le galactose et la teneur en chacune des enzymes assurant le métabolisme de ce sucre.

Adaptation simple. — Au cours de l'expérience dont les résultats ont été représentés dans la figure 41, une partie aliquote des cellules de levure a été placée dans l'appareil de WARBURG, dans des conditions analogues à celles du reste de la suspension (sur laquelle les activités enzymatiques ont été mesurées), et la vitesse globale d'adaptation suivie par l'évolution du QO_2 sur galactose.

On voit, sur la figure 41, que la courbe obtenue suit de très près la cinétique d'apparition de la perméabilité envers le galactose ⁽¹⁾. Étant donné que dans les conditions employées, les cinétiques des trois enzymes étudiées sont très voisines, on peut dire que, dans son ensemble, la cinétique d'induction du système, mesurée par la respiration du galactose par les cellules intactes, reflète fidèlement la teneur en enzymes du galactose de ces mêmes cellules.

Dans les conditions standard utilisées (cellules en fin de croissance exponentielle, incubation aérobie, en présence de galactose à 2 p. 100, L-tryptophane 10 μ g/ml, tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0), les AO_2 galactose ⁽²⁾ se situent entre 11 et 19, la moyenne de toutes les valeurs obtenues étant 15.

Adaptation double. — Lorsque les levures ayant effectué leur croissance en anaérobiose, sur glucose, sont mises en contact avec du galactose, elles doivent former à la fois les enzymes leur permettant d'utiliser le galactose, et les enzymes de la respiration terminale. Une telle « adaptation double » a déjà été utilisée par SLONIMSKI (1956) pour son étude de l'énergétique de l'adaptation enzymatique chez les levures.

Au cours du présent travail, il a été constaté que le taux d'adaptation moyen sur galactose ($AO_2 = 15$) est le même, que l'on s'adresse à des cellules aérobies, possédant par conséquent toutes les enzymes respiratoires, ou à des cellules anaérobies, réalisant ensuite une adaptation double, respiration terminale et enzymes du galactose.

⁽¹⁾ Celle-ci, chez la souche CH-1, représente en fait l'accumulation de tréhalose, à partir de galactose, sous l'influence de la galactose-perméase (voir 5.3). Toutefois, comme cela a déjà été signalé au cours du chapitre précédent, les vitesses mesurées à l'aide de cette souche peuvent être considérées comme les vitesses maximales d'« entrée » du galactose, puisque le produit accumulé est différent du galactose et ne peut, par conséquent modifier l'équilibre de la réaction.

⁽²⁾ Au cours de ce chapitre, il sera parlé d' AO_2 glucose ou d' AO_2 galactose, selon que l'on mesure l'adaptation respiratoire, le substrat étant alors le glucose, ou l'adaptation au galactose.

Il ne semble donc pas que le fait de former adaptativement deux séries d'enzymes au lieu d'une, produise une inhibition, ni une stimulation, du taux de formation des enzymes du métabolisme du galactose. On pouvait donc penser que le facteur limitant la respiration en présence de galactose, au cours de l'adaptation double, était la quantité d'enzymes du métabolisme du galactose présentes, et non la quantité d'enzymes respiratoires.

Afin de vérifier cette hypothèse, une expérience a été effectuée dont les résultats sont représentés dans la figure 43. A des levures provenant d'une culture anaérobie, puis mises en contact aérobiquement avec le galactose, on a ajouté de l'éthanol à 2 p. 100, à deux moments différents.

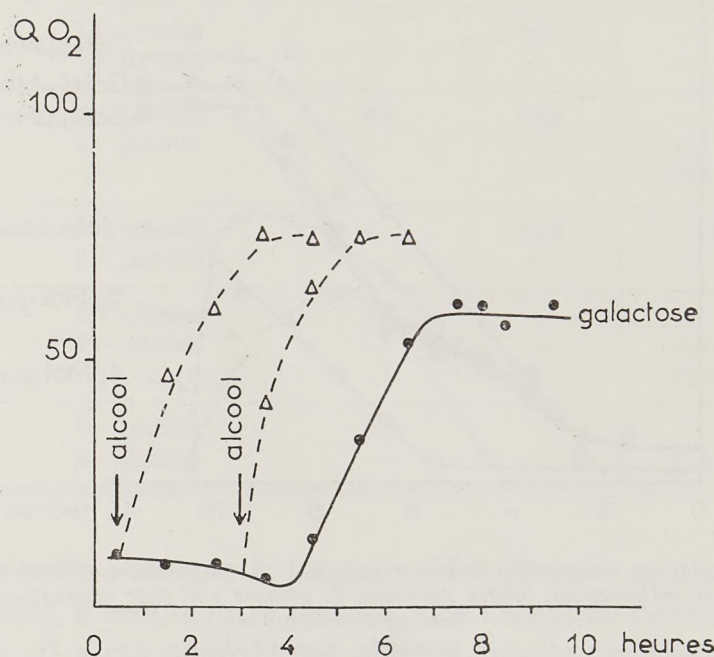


FIG. 43. — Mesure du potentiel respiratoire au cours de l'adaptation au galactose. La capacité respiratoire est mesurée par addition d'éthanol (voir texte) aux moments indiqués par les flèches. La respiration endogène a été déduite des valeurs obtenues. Souche CH-1, cultivée en anaérobiose.

On voit que, surtout en ce qui concerne la seconde addition (après trois heures d'incubation avec le galactose), le potentiel respiratoire des cellules permet un QO_2 immédiat de 40 (au-dessus de l'endogène), alors que le QO_2 observé sur galactose seul n'est encore que de 7. Ces résultats montrent que, dans les conditions expérimentales employées, les enzymes de la respiration sont formées avant les enzymes du métabolisme du galactose. L'évolution des QO_2 galactose, même dans les conditions de l'adaptation double, dépend donc strictement de la formation des enzymes assurant le métabolisme du galactose.

C) Influence d'une source additionnelle d'énergie sur la vitesse de l'adaptation au galactose (AO_2 galactose)

SLONIMSKI, (1956), avait déjà observé que l'addition de petites quantités de glucose à des levures anaérobies (*S. cerevisiae*, Yeast foam), s'adaptant sur galactose, provoque une stimulation du taux de cette adaptation.

Les courbes de la figure 44 montrent qu'une telle stimulation est également observée avec la souche CH-1. On peut déduire de ces courbes que :

1) L' AO_2 glucose est limité par la quantité de glucose apportée : il est, dans cette expérience, égal à 6, pour 1 μ mole de glucose/ml, et égal à 8, pour une quantité double de glucose.

2) Lorsque l'adaptation a lieu en présence de galactose et des mêmes petites quantités de glucose, on voit que la courbe de l'adaptation suit deux pentes ; la

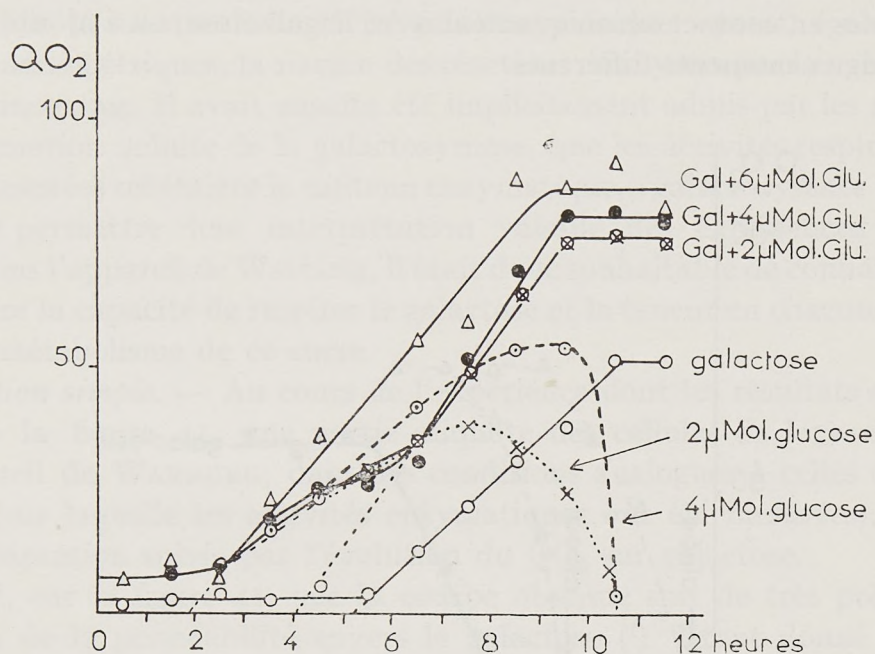


FIG. 44. — Adaptation double « galactose + respiration terminale » et influence de petites quantités de glucose sur cette adaptation. Endogènes déduits. *S. cerevisiae*, souche CH-1.

première est voisine de celle obtenue sur glucose seul, la seconde — démarrante lorsque le QO_2 glucose maximum n'est pas encore atteint (dans la cupule contenant le glucose seul) — est nettement plus forte que celle obtenue pour l'adaptation sur galactose seul.

Ces résultats sont confirmés par ceux de deux autres expériences indépendantes, résultats qui sont résumés dans le tableau 19. On voit que la dose de 6 μ moles de glucose est déjà trop élevée pour permettre de distinguer la consommation du glucose de celle du galactose.

On peut donc conclure de ces expériences que l'énergie fournie par l'utilisation aérobie du glucose, pendant le début de la formation induite des enzymes du métabolisme du galactose, augmente la vitesse avec laquelle ces enzymes sont formées.

D) Les enzymes du métabolisme du galactose. — Biosynthèse induite

Il était apparu, dès le début de ce travail, que l'adaptation au galactose de la souche CH-1, qui requiert le tryptophane pour sa croissance, est nulle ou très lente en absence de cet acide aminé. Cette observation montre qu'il s'agit très probablement d'une biosynthèse protéique *de novo*, puisque l'absence d'un acide aminé essen-

TABLEAU 19

*Effet de petites quantités de glucose sur l'adaptation à la respiration
en présence de glucose et de galactose*

Galactose	Glucose ajouté	AO ₂ -glucose		AO ₂ -galactose	
		(Exp. A)	(Exp. B)	(Exp. A)	(Exp. B)
—	2 %	9,5	11,0	—	—
2 %	—	—	—	8,0	11,0
—	1 μ mole	—	6,0	—	—
2 %	1 μ mole	—	—	—	12,0
—	1,5 μ moles	—	9,0	—	—
2 %	1,5 μ moles	—	—	—	12,0
—	2 μ moles	6,0	10,0	—	—
2 %	2 μ moles	—	—	6,0 (1 ^{re} pente) 15,5 (2 ^e pente)	13,0
—	3 μ moles	—	13,0	—	—
2 %	3 μ moles	—	—	—	13,0
—	4 μ moles	8,0	—	—	—
2 %	4 μ moles	—	—	9,5 (1 ^{re} pente) 12,5 (2 ^e pente)	—
—	6 μ moles	12,5	—	—	—
2 %	6 μ moles	—	—	12,5	—

tiel à la croissance suffit à bloquer la formation des enzymes assurant le métabolisme du galactose. De plus, il sera montré plus loin que l'addition de ce même acide aminé suffit à la rétablir. Il a été montré, par ailleurs, que la formation des enzymes du métabolisme du galactose est étroitement dépendante de la présence d'un métabolisme énergétique. Les deux critères qui avaient été définis au cours de l'introduction à ce chapitre — présence d'une source d'énergie métabolisable, présence de tous les acides aminés indispensables — se trouvent donc satisfaits, et l'on peut considérer qu'il s'agit dans ce cas d'une « biosynthèse induite ».

6.6 ÉTUDE COMPARATIVE DES VITESSES DE BIOSYNTHÈSE DE PLUSIEURS ENZYMES INDUCTIBLES

Dans le cas de la β -galactosidase de *E. coli*, le « taux différentiel de synthèse » (accroissement de la masse enzymatique mesurée par son activité par rapport à l'accroissement de la masse cellulaire) est une fonction linéaire, montrant ainsi que la β -galactosidase synthétisée représente toujours une fraction constante de l'ensemble des protéines synthétisées dans le même temps (MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE, 1952).

L'étude de la biosynthèse induite des protéines avait amené certains auteurs à introduire le concept de « biosynthèse préférentielle » (RICKENBERG et LESTER, 1955). Ce concept était fondé sur le fait que, au cours de la phase de latence qui sépare l'utilisation d'un substrat carboné (glucose ou maltose) de celle du lactose, la β -galac-

tosidase se trouve induite, sans augmentation notable de masse protéique. Il était donc tentant de penser que, dans certaines conditions, la biosynthèse des protéines inducibles pouvait avoir lieu sélectivement.

Cependant, les expériences de MANDELSTAMM (1957) ont montré qu'un "turn-over" protéique important existe chez *E. coli*, dans les conditions de non-croissance. Dans de telles conditions, la biosynthèse de la β -galactosidase peut encore être induite, mais elle s'établit à une vitesse qui est du même ordre de grandeur que le "turn-over" protéique mesurable.

Les conditions des expériences de MANDELSTAMM (1957) étant très voisines de celles employées par RICKENBERG et LESTER (1955), il semble très probable que la biosynthèse de la β -galactosidase observée par ces derniers auteurs s'accompagne d'un "turn-over" protéique. L'existence d'une biosynthèse protéique préférentielle dans le sens que lui attribuent RICKENBERG et LESTER — synthèse d'une espèce protéique définie dans des conditions qui ne permettent pas la synthèse des autres protéines cellulaires — semble donc très peu probable.

Lorsque l'on compare, chez la levure, les vitesses de formation de plusieurs enzymes adaptatives, induites en absence de croissance, on obtient pour certaines d'entre elles des allures très comparables, comme cela vient d'être montré dans le cas des enzymes du métabolisme du galactose (*cf.* fig. 41). Dans d'autres cas, cependant, tel que l'induction par l'oxygène des enzymes de la respiration terminale chez les levures, des différences plus importantes ont été trouvées dans les cinétiques d'induction des différentes enzymes.

Des travaux récents semblent indiquer qu'il s'agissait, au moins en ce qui concerne ce système, soit d'induction sub-optimale, soit d'un phénomène d'adaptation, différent d'une biosynthèse *de novo* :

— En effet, en ce qui concerne la cytochrome *c*-peroxydase, par exemple, SELS (1958a et b) a pu montrer que l'induction par le cytochrome *c* et l' O_2 (au lieu de l' O_2 seulement) suffit à rétablir une cinétique normale d'induction.

KATTERMAN et SLONIMSKI (1960) viennent de montrer que l'apparition de la L-lactico-cytochrome *c*-réductase en aérobiose, correspond vraisemblablement à une conversion de l'enzyme à spécificité D-lactique, qui se forme en anaérobiose.

Il est évident, toutefois, que la comparaison des vitesses de biosynthèse de deux enzymes différentes est assez délicate, puisque la mesure ne porte pas sur des quantités pondérables d'enzymes, mais sur des activités, généralement exprimées en unités arbitraires. On ignore, dans la plupart des cas, le poids moléculaire et, par conséquent, l'activité moléculaire spécifique des enzymes étudiées. Néanmoins, si l'on possède un facteur permettant de limiter la synthèse protéique de manière quantitative, il est possible d'étudier comparativement l'influence de ce facteur sur la vitesse de biosynthèse de plusieurs enzymes. C'est pourquoi il m'a semblé que l'exigence de la souche CH-1 pour le tryptophane était propre à permettre une telle comparaison.

A) Choix du système enzymatique de comparaison

La formation des enzymes de la respiration terminale est inhibée par plusieurs analogues d'acides aminés (SLONIMSKI, 1956). Des expériences récentes (KATTERMAN et SLONIMSKI, 1960) montrent qu'il s'agit très probablement d'une biosynthèse *de*

novo, pour au moins deux des enzymes de ce système complexe : la cytochrome-oxydase et la succino-cytochrome *c*-réductase. On sait, d'autre part (SLONIMSKI, 1956) que le QO_2 glucose observé au cours de l'adaptation respiratoire est proportionnel à la quantité de cytochrome-oxydase présente. C'est pourquoi il m'a semblé que le système de la respiration terminale chez la levure offrait des critères équivalents à ceux du système du métabolisme du galactose, définis précédemment.

Ces deux systèmes présentent par ailleurs des différences importantes, concernant :

- L'inducteur : oxygène, pour l'un, galactose pour l'autre.
- La fonction : activation de l'oxygène, transport d'électron pour l'un ; phosphorylation, transport d'un groupement nucléotidique, épimérisation, pour l'autre.
- La structure : groupements prosthétiques flavo-hémoprotéiques dans un cas ; pas de groupement prosthétique connu, dans l'autre cas.
- La localisation intracellulaire : enzymes partiellement ou totalement associées aux particules cytoplasmiques dans un cas ; totalement solubles, dans l'autre cas.

B) *Comparaison de l'effet du tryptophane sur la vitesse de la biosynthèse induite dans les deux systèmes enzymatiques choisis :*

Les expériences ont été effectuées à l'aide de la souche CH-1. Il avait tout d'abord semblé souhaitable d'obtenir une adaptation aussi faible que possible en absence de tryptophane. Toutefois, les essais effectués après carence en tryptophane se sont

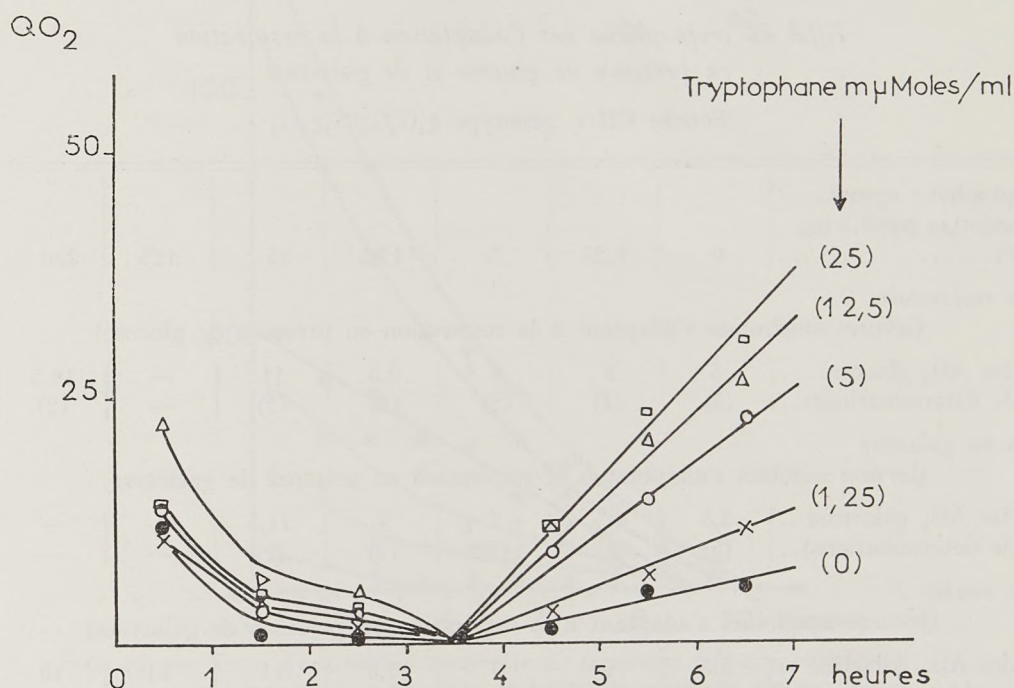


FIG. 45. — *Adaptation à la respiration en présence de galactose et sa stimulation par le tryptophane.*

Les valeurs mises entre parenthèses représentent la quantité de tryptophane ajoutée en mμ. moles par ml et par 0,5 mg de poids sec.

révélés peu encourageants, les cellules obtenues étant fréquemment peu ou pas adaptables, même en présence de tryptophane ajouté.

Néanmoins, comme le montre la figure 45, les cellules (prélevées à la fin de la

phase exponentielle) présentent un AO_2 galactose très faible, en absence de tryptophane exogène. Il semble vraisemblable que la légère synthèse que l'on observe avec des cellules non-carencées (sans addition de tryptophane) soit due à un apport endogène (« turn-over » protéique).

On voit, sur la figure 45, qu'après une période de latence, pendant laquelle les QO_2 endogènes sont retombés à une valeur négligeable, l'adaptation commence partout à se produire au cours de la 4^e heure, quelle que soit la quantité de tryptophane ajoutée, et même en absence de tryptophane exogène. Il semble donc que la présence de tryptophane n'a aucun effet sur la durée de la période de latence. Au contraire, les vitesses d'adaptation obtenues sont d'autant plus rapides que la quantité de tryptophane ajoutée est plus grande.

Des résultats semblables sont obtenus lorsqu'on étudie l'adaptation respiratoire de levures cultivées en anaérobiose. Les levures anaérobies permettent, de plus, comme cela a été montré précédemment, d'étudier l'adaptation au galactose, indépendamment de l'adaptation respiratoire.

Les résultats de cette étude comparative sont résumés dans le tableau 20. On voit que la stimulation produite par des doses croissantes de tryptophane (0 à 625 μ moles par ml et par 0,5 mg P. s.) est du même ordre de grandeur, qu'il s'agisse de l'adaptation respiratoire, de l'adaptation au galactose, ou de l'adaptation double. La saturation (obtention d'un AO_2 moyen de 11) est obtenue, dans les trois cas, pour une dose de tryptophane égale à 25 μ moles.

TABLEAU 20

*Effet du tryptophane sur l'adaptation à la respiration
en présence de glucose et de galactose*

Souche CH-1, génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$

L-tryptophane ajouté (en μ moles/ml et par 0,5 mg poids sec)	0	1,25	5	12,5	25	125	250	625
<i>Adaptation respiratoire</i> (levures anaérobies s'adaptant à la respiration en présence de glucose)								
Moyenne des AO_2 glucose....	5	8	8	9,5	11	—	10,5	12
(Nombre de déterminations)...	(5)	(1)	(2)	(3)	(2)	—	(2)	(2)
<i>Adaptation au galactose</i> (levures aérobies s'adaptant à la respiration en présence de galactose)								
Moyenne des AO_2 galactose ..	3,5	4,5	7	9	11,5	—	—	14
(Nombre de déterminations)...	(5)	(1)	(2)	(2)	(2)	—	—	(4)
<i>Adaptation double</i> (levures anaérobies s'adaptant à la respiration en présence de galactose)								
Moyenne des AO_2 galactose ..	5,5	6	7	7,5	11	11	10	11
(Nombre de déterminations)...	(5)	(1)	(2)	(3)	(2)	(2)	(1)	(2)

Ces résultats montrent, par conséquent que les vitesses de la biosynthèse induite des deux systèmes étudiés sont influencées de façon similaire par la concentration exogène d'un acide aminé indispensable, le tryptophane. Il ne semble donc pas qu'il y ait lieu d'admettre, dans ce cas précis, une synthèse préférentielle de l'un des systèmes étudiés par rapport à l'autre.

C) Effet du tryptophane sur la quantité totale d'enzymes formées

On pouvait également se demander si la concentration en tryptophane n'exerçait pas un effet sur la quantité finale d'enzymes formées. Dans la plupart des expériences qui ont été effectuées au cours de ce travail, il n'a pas été possible de poursuivre les mesures pendant un temps suffisamment long. Cependant, dans deux cas, pour des doses limitantes de 5 et 12,5 μ moles de tryptophane, les QO_2 finaux ont atteint la valeur observée sur glucose, en présence d'un excès de tryptophane. Ces deux résultats permettent par conséquent de supposer que la limitation en tryptophane est sans effet sur la teneur finale en enzymes.

6.7 ADAPTATION EN ANAÉROBIOSE

A) Cellules non-proliférantes :

Toutes les expériences d'adaptation dont il a été question jusqu'à maintenant ont été effectuées en aérobiose. Les nombreux essais que j'ai effectués au cours de ce travail pour obtenir l'adaptation de cette souche de *S. cerevisiae*, CH-1, en anaérobiose et en absence de croissance, ont tous été négatifs.

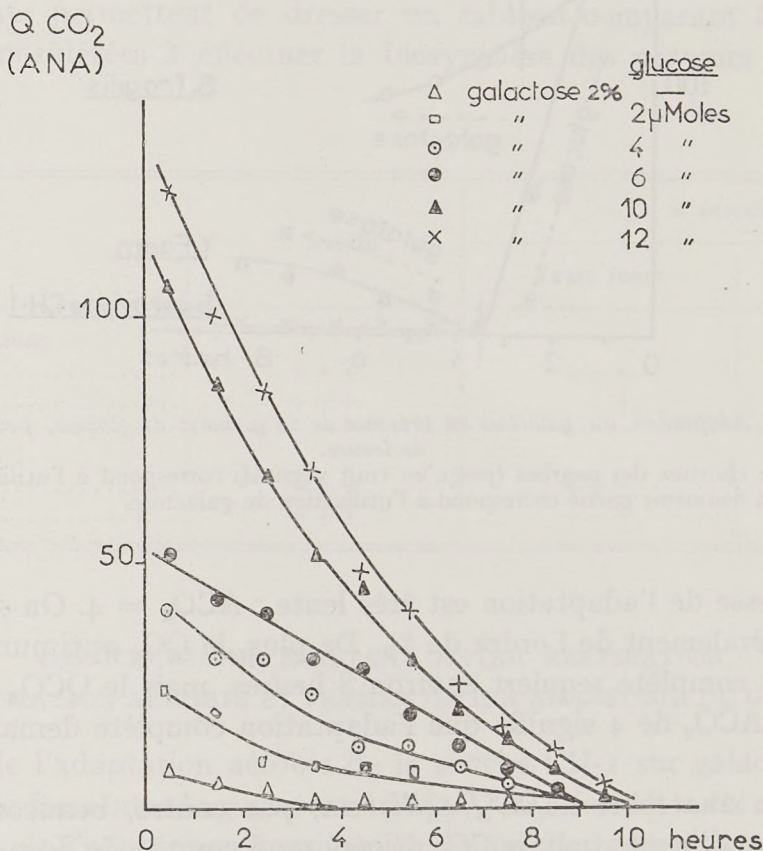


FIG. 46. — Essai d'adaptation anaérobie de la souche CH-1 (*S. cerevisiae*) en absence et en présence de petites quantités de glucose.

Les expériences de LINDENGREN et PALLERONI (1952) avaient montré que l'adaptation en anaérobiose observée par REINER et SPIEGELMAN (1947) était due, dans la plupart des cas, à la présence de glucose dans le galactose utilisé par ces derniers auteurs. Les résultats négatifs que j'ai obtenus pouvaient donc provenir de ce que le galactose utilisé comme inducteur et substrat au cours de ce travail était trop pur. Cependant, comme le montre la figure 46, l'addition de quantités de glucose allant

jusqu'à 12 μ moles (ce qui permet d'assurer pendant 6 à 9 heures une fermentation importante) n'a pas permis l'adaptation de cette souche en anaérobiose. Il en est de même lorsque le glucose est ajouté à des temps variables, après le début de l'incubation.

Ces expériences ont été répétées à l'aide de deux autres souches diploïdes, de type sauvage, Yeast foam (*S. cerevisiae*,) et *S. fragilis*. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 47. On voit que, en présence de 10 μ moles de glucose l'adaptation de la souche Yeast foam commence après une période de latence de trois heures.

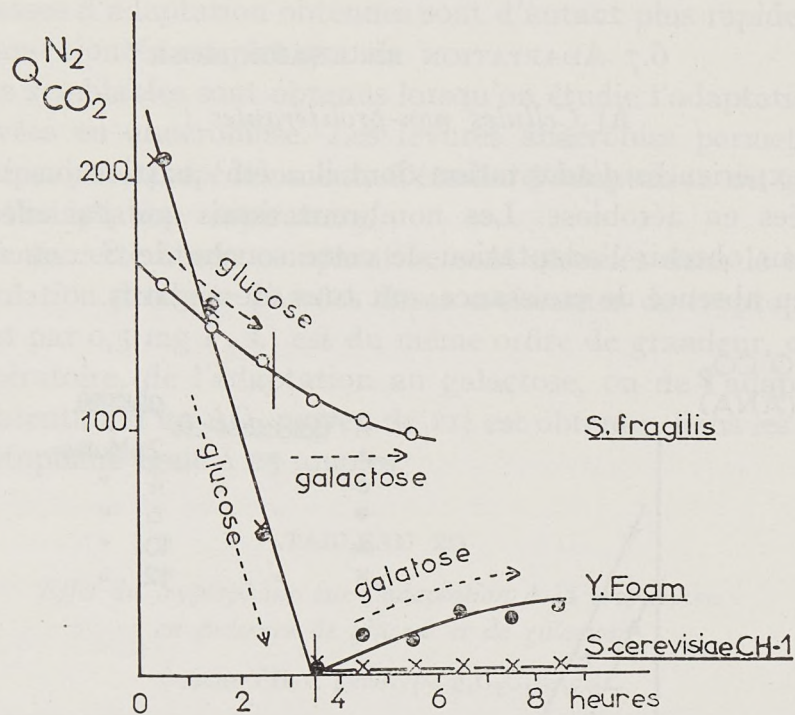


FIG. 47. — Adaptation au galactose en présence de 10 μ moles de glucose, pour différentes souches de levure.

La première partie de chacune des courbes (jusqu'au trait vertical) correspond à l'utilisation anaérobie du glucose ajouté ; la deuxième partie correspond à l'utilisation du galactose.

Toutefois, la vitesse de l'adaptation est très lente : $ACO_2 = 4$. On sait en effet que les AO_2 sont généralement de l'ordre de 15. De plus, le QO_2 optimum étant environ 120, l'adaptation complète requiert environ 8 heures, mais le QCO_2 optimum étant environ 300, un ACO_2 de 4 signifie que l'adaptation complète demanderait environ 75 heures :

L'adaptation anaérobie de *S. fragilis* est, par contre, beaucoup plus rapide. Après trois heures d'incubation, le CO_2 dégagé rend compte de 80 p. 100 du glucose ajouté, ce qui correspond à l'utilisation complète du glucose telle qu'elle peut être mesurée dans les mêmes conditions, environ 20 p. 100 de ce sucre étant « assimilé ». La fermentation se poursuit pourtant au-delà de cette période, le QCO_2 étant environ 100 après 5 heures. Si l'on suppose que l'adaptation ait commencé immédiatement après l'addition du galactose, ceci correspondrait à un ACO_2 minimum égal à 20.

Cette étude n'a pas été poussée plus avant, mais on voit que la faculté de s'adapter anaérobiquement au galactose peut être très différente selon les souches. Plu-

sieurs hypothèses pourraient être avancées pour expliquer ces différences : — capacité de former des réserves endogènes fermentescibles, — perméabilité au galactose, différentes en anaérobiose, — différence dans la capacité d'éliminer un répresseur endogène, plus stable en anaérobiose qu'en aérobiose.

B) Cellules proliférantes :

L'incapacité présentée par la souche CH-1 de s'adapter anaérobiquement à l'utilisation du galactose n'est cependant pas absolue. Les cellules de cette souche, provenant de cultures aérobies ou anaérobies en milieu 3S glucose, ne présentent qu'une croissance très faible, même après cinq jours de contact avec le galactose en milieu naturel 3S. Elles restent cependant capables de s'adapter aérobiquement au galactose. Mais si le milieu 3S galactose est additionné de 0,1 p. 100 de glucose on constate que la croissance se poursuit, après épuisement du glucose. Les cellules ainsi obtenues sont alors capables de fermenter anaérobiquement le galactose avec des QCO_2 approchant, ou égaux, à ceux des cellules adaptées aérobiquement, puis cultivées en anaérobiose sur galactose.

Ces résultats permettent de dresser un tableau comparant les capacités des trois souches considérées à effectuer la biosynthèse des enzymes du métabolisme du galactose :

	S. fragilis	S. cerevisiae	
		Yeast foam	CH-1
<i>Cellules non-proliférantes :</i>			
en aérobiose	+++	+++	+++
en anaérobiose	+++	+	0
<i>Cellules proliférantes :</i>			
en aérobiose	+++	+++	+++
en anaérobiose	+++	+++	++

6.8 RELATIONS EXISTANT ENTRE RESPIRATION, FERMENTATION AÉROBIE ET FERMENTATION ANAÉROBIE DU GALACTOSE

Au cours de l'adaptation aérobie de la souche CH-1 sur galactose, l'évolution de la capacité de fermenter le galactose à l'air (QCO_2 (ferm.)) a été suivie.

Dans le cas de l'adaptation respiratoire, les cellules possèdent une capacité fermentaire vis-à-vis du substrat. Celle-ci, égale au départ au $Q_{CO_2}^N$ (environ 300), baisse au cours de l'adaptation respiratoire, par suite de l'installation d'un « effet Pasteur ».

Dans le cas du galactose, on constate que le QCO_2 (ferm.) est nul au début de l'adaptation et n'augmente que lentement au fur et à mesure que l'adaptation (mesurée par l'accroissement du QO_2) progresse.

Si l'on porte les QCO_2 (ferm.) obtenus au cours de plusieurs expériences, en fonction des QO_2 correspondants, on constate que tous les points, à une exception

près, se placent sur une droite (voir figure 48). On voit donc qu'après un certain retard, chaque accroissement du QO_2 correspond à un accroissement égal du QCO_2 (ferm.). Toutefois, lorsqu'on atteint le QO_2 optimum, le QCO_2 (ferm.) cesse de s'accroître. On n'atteint donc jamais les valeurs élevées de QCO_2 auxquelles on devrait théoriquement s'attendre.

Ces résultats pourraient, à première vue, s'interpréter sur la base d'un « effet Pasteur » qui serait beaucoup plus marqué, ou beaucoup plus immédiat avec le galactose qu'avec le glucose. Toutefois, si l'on mesure le $Q_{CO_2}^{N_2}$ des mêmes cellules, on constate que la capacité fermentaire aérobie, ou anaérobie des cellules ayant effectué leur adaptation ou leur croissance en aérobiose sur galactose, est toujours très faible. Dans trois expériences indépendantes les trois valeurs QO_2 , $Q_{CO_2}^{N_2}$, et QCO_2 (ferm.) ont été mesurées sur une même suspension cellulaire. L'effet Pasteur

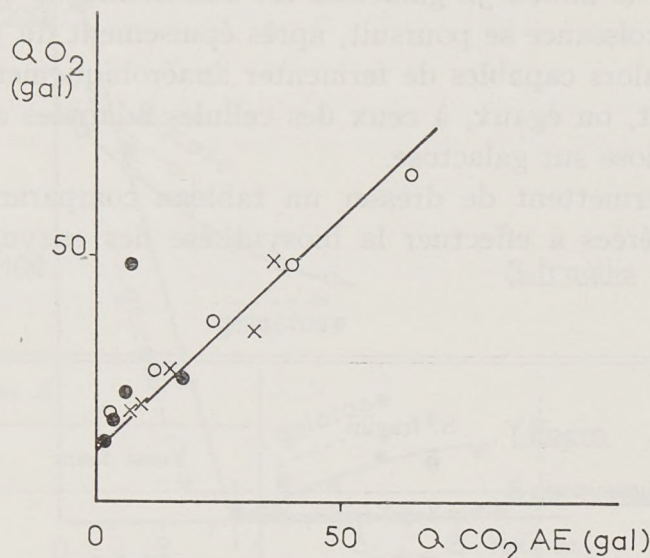


FIG. 48. — Relation entre les QO_2 et les QCO_2 aérobies de levures s'adaptant au galactose en aérobiose. *S. cerevisiae* CH-1 ; les endogènes ont été déduits.

peut donc être calculé d'une manière approximative, par l'application de la formule :

$$\frac{Q_{CO_2}^{N_2} - QCO_2 \text{ (ferm.)}}{QO_2}$$

Les valeurs obtenues sont les suivantes : 0,2 ; 0,3 et 0. On voit qu'il y a donc ici absence absolue d'effet Pasteur.

Les résultats précédents peuvent toutefois s'expliquer très aisément si l'on admet que ce qui limite l'acquisition d'un QCO_2 élevé est la quantité d'enzymes du galactose présentes.

En effet, on sait que le K_m de la respiration en présence de glucose est environ 5×10^{-4} M tandis que celui de la fermentation de ce sucre est de l'ordre de 1×10^{-2} M.

On peut donc concevoir que des quantités sub-optimales d'enzymes du métabolisme du galactose pourraient permettre seulement la saturation du système respiratoire, mais non celle du système fermentaire.

Dans la figure 49 sont rassemblés les résultats des mesures effectuées au cours d'une série d'expériences indépendantes, concernant les valeurs de QO_2 et de $Q_{CO_2}^{N_2}$

présentées par des levures ayant effectué leur adaptation au galactose en aérobiose. Les capacités respiratoires ou fermentaires vis-à-vis du glucose n'étant pas toujours identiques d'une expérience à l'autre (traduisant des états physiologiques légèrement différents), les résultats ont été exprimés en p. 100 de la valeur correspondante sur glucose.

On voit que si l'adaptation aérobique sur galactose permet d'obtenir des QO_2 galactose identiques aux QO_2 glucose, il n'en est pas de même pour les $Q_{CO_2}^N$. En effet, ces derniers ne dépassent pas 50 p. 100 de la capacité fermentaire observée sur glucose.

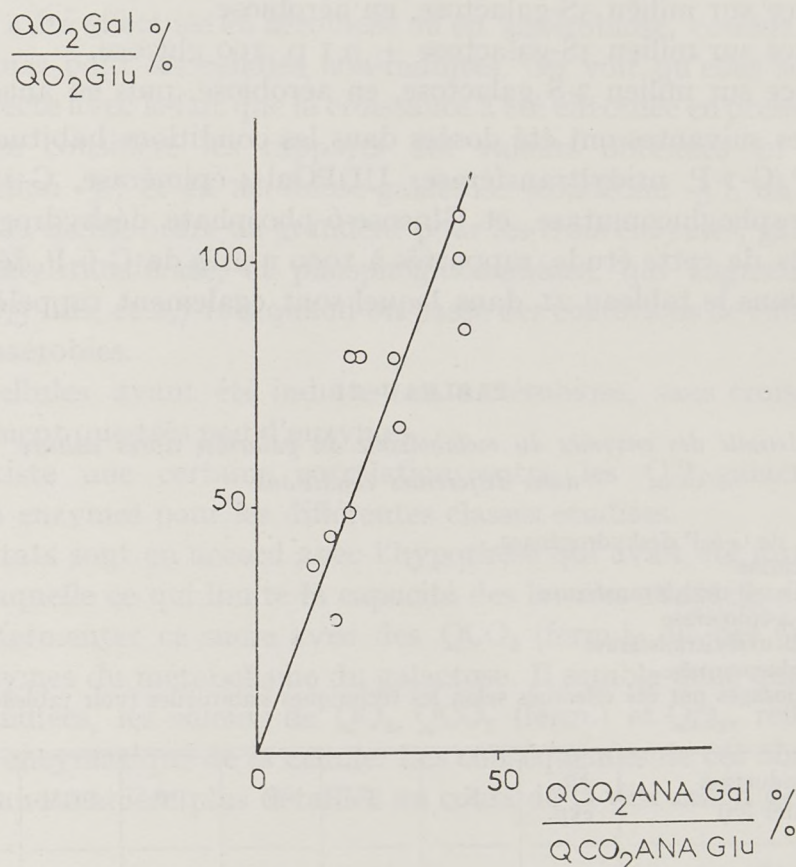


FIG. 49. — Relation entre la capacité de respirer et la capacité de fermenter le galactose.
S. cerevisiae CH-I.

Les valeurs obtenues ont été rapportées à celles obtenues avec le glucose pour les mêmes suspensions.

Il ne peut, dans ce cas, être question d'effet Pasteur, comme cela a été montré précédemment. Au contraire, l'hypothèse d'un potentiel enzymatique insuffisant pour assurer un taux de fermentation optimum, permet de rendre compte des résultats.

Il est, de plus, remarquable que ce sont seulement les cellules cultivées en anaérobiose sur galactose (après préinduction aérobique) qui ont permis d'obtenir des QCO_2 anaérobies élevés et égaux aux QCO_2 observés sur glucose.

L'étude comparative de la teneur en enzymes du métabolisme du galactose présentes, dans des cellules cultivées ou induites, dans diverses conditions, semblait donc indispensable.

6.9 TENEUR EN ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE EN RAPPORT AVEC LE MODE D'ADAPTATION

La souche CH-1 (*S. cerevisiae*, diploïde, galactose positive) a été cultivée, ou induite, dans les conditions suivantes :

1. Croissance sur milieu naturel 3S-glucose
 - en aérobiose
 - en anaérobiose.
2. Croissance sur milieu 3S-glucose, puis incubation en anaérobiose en milieu 3S-galactose, pendant 3 à 5 jours.
3. Croissance sur milieu 3S-galactose, en aérobiose.
4. Croissance sur milieu 3S-galactose + 0,1 p. 100 glucose.
5. Croissance sur milieu 3-S galactose, en aérobiose, puis en anaérobiose.

Les enzymes suivantes ont été dosées dans les conditions habituelles : Galactokinase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, UDPGal-4-épimérase, G-1-P/PP uridyltransférase, Phosphoglucomutase, et Glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Les résultats de cette étude, rapportés à 1000 unités de G-6-P déshydrogénase, sont consignés dans le tableau 21 dans lequel sont également rappelées les valeurs

TABLEAU 21

*Activité des enzymes du métabolisme du galactose après culture
dans différentes conditions*

Unités pour 1 000 U. de G-6-P déshydrogénase.

K : Galactokinase
T : Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase
E : UDPGal-4-épimérase
PP : G-1-P/PP uridyltransférase
PGM : Phosphoglucomutase.

Les extraits et dosages ont été effectués selon les techniques habituelles (voir tableaux précédents).

Conditions d'induction (milieu naturel 3S)	Nb. exp.	K	T	E	PP	PGM	$Q_{CO_2}^{N_2}$ Gal/Glu %
I. Non induites { AE.....	2	0,2	0,2	0,1	198	91	0
ANA.....	2	0,2	0,3	0,1	209	82	0
II. Incubées, ANA, Gal	4	15	70	22	234	109	0 à 20 %
III. Induites, AE, Gal	2	43	189	68	274	165	env. 50 %
IV. Incubées, ANA, Gal + Glu..	2	156	456	45	246	271	80 à 100 %
V. Pré-induites, AE, Gal, puis..	3	135	475	72	270	440	100 %
Cultivées, ANA, Gal							
Augmentation maximum d'activité		780 X	2 375 X	720 X	1,4 X	5,1 X	
Augmentation d'activité entre aérobiose et anaérobiose (ANA V/AE III)		3,1 X	2,5 X	0	0	2,7 X	env. 2X

moyennes des $Q_{CO_2}^{N_2}$ -galactose (en p. 100 du Q_{CO_2} -glucose correspondant), obtenues pour les cellules intactes, après culture, ou induction, dans ces différentes conditions.

On voit que :

- 1) Ici encore les teneurs en enzymes du métabolisme du galactose sont très

faibles dans les cellules non-induites, et augmentent considérablement après culture sur galactose.

2) Les cellules cultivées en anaérobiose sur galactose (conditions -4, et -5.) sont plus riches en galactokinase et en Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase que les cellules cultivées sur galactose en aérobiose (condition -3). La teneur en UDPGal-4-épipimérase demeure constante.

3) Comme cela avait été montré dans le chapitre 4, la teneur en G-1-P/PP uridyltransférase varie peu, quelles que soient les conditions de culture ou d'induction.

4) Par contre, il est surprenant de constater que la teneur en phosphoglucomutase varie considérablement. Ces variations ne sont pas en relation avec le fait que la culture a été effectuée en aérobiose ou en anaérobiose, comme le montrent les valeurs obtenues pour les cellules non-induites. On voit qu'elles sont au contraire en relation directe avec le fait que la croissance a été effectuée en présence de galactose.

5) Si l'on considère les rapports des valeurs obtenues en anaérobiose-galactose (condition -5.) et en aérobiose-galactose (condition -3.), on constate que la variation est du même ordre de grandeur pour les trois enzymes, galactokinase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, et phosphoglucomutase, qui augmentent respectivement 3 fois, 2,5 fois, et 2,7 fois quand on passe des conditions de culture aérobies aux conditions anaérobies.

6) Les cellules ayant été induites en anaérobiose, sans croissance (condition -2), ne renferment que très peu d'enzymes.

7) Il existe une certaine corrélation entre les $Q_{CO_2}^{N_2}$ -galactose observés et les teneurs en enzymes pour les différentes classes étudiées.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse qui avait été formulée précédemment, selon laquelle ce qui limite la capacité des levures adaptées aérobiquement au galactose, à fermenter ce sucre avec des Q_{CO_2} (ferm.), ou des $Q_{CO_2}^{N_2}$ élevés, est la teneur en enzymes du métabolisme du galactose. Il semble donc que, dans toutes les conditions étudiées, les valeurs de Q_{O_2} , Q_{CO_2} (ferm.) et $Q_{CO_2}^{N_2}$, reflètent fidèlement l'équipement enzymatique de la cellule. Les conséquences de ces observations seront envisagées d'une manière plus détaillée au cours de la discussion de ce chapitre.

6.10 DISCUSSION

Un certain nombre de points qui résultent des expériences présentées au cours de ce chapitre seront discutés ici. Certains d'entre eux seront toutefois à nouveau évoqués au cours de la discussion générale (cf. 7).

1) *Caractère inductible des quatre enzymes du métabolisme du galactose chez S. cerevisiae et S. fragilis.*

Les résultats obtenus ont tout d'abord confirmé ce qui ressortait déjà des expériences présentées au cours du chapitre précédent, à savoir, le caractère inductible, des quatre enzymes du métabolisme du galactose : Galactose-perméase, Galactokinase, Gal-1-P G-1-P uridyltransférase, et UDPGal-4-épipimérase, chez *S. cerevisiae*. Il a, de plus, été montré qu'il en est de même chez *S. fragilis*. Le désaccord entre ces derniers résultats et ceux de MILLS et coll. (1957) concernant la présence de

l'UDPGal-4-épimérase chez une souche de *S. fragilis* non-induite, n'a pu être expliqué.

Le caractère adaptatif des enzymes du métabolisme du galactose semblait à peu près certain. En effet, les auteurs ayant effectué des préparations de certaines de ces enzymes ou des produits de leur métabolisme chez la levure, avaient trouvé qu'il était nécessaire d'employer des cellules ayant effectué leur croissance en présence de galactose (*cf.* TRUCCO et coll., 1948 ; KALCKAR et coll., 1953 ; LELOIR, 1951). Il n'y avait cependant, dans ces travaux aucune indication précise de la quantité d'enzymes pouvant pré-exister dans les cellules non-induites.

Les expériences effectuées au cours de ce travail ont permis de préciser que les quantités d'enzymes présentes dans les cellules non-induites (*S. cerevisiae* ou *S. fragilis*) étaient dans tous les cas inférieures à 1 p. 100 des quantités présentes dans les cellules induites.

Les quatre enzymes du métabolisme du galactose apparaissent donc comme étant pleinement inductibles.

2) Induction chez le mutant 1235/2b. — « Adaptation simultanée ».

Les expériences qui ont été effectuées au cours de ce travail montrent que le schéma de l'« induction séquentielle » (STANIER, 1950) ne s'applique pas au cas des enzymes du métabolisme du galactose, chez la levure.

En effet, l'étude enzymatique du mutant de génotype $g_1G_2G_3$, galactokinase négatif, a montré que, après induction, les deux enzymes du métabolisme du galactose, situées après la galactokinase, ainsi que la galactose-perméase, étaient présentes en quantités comparables à celles trouvées dans les autres souches induites. (voir tableau 12).

Les résultats présentés dans le précédent chapitre ont montré, d'autre part, que ce mutant ne formait aucune trace décelable de Galactose-1-Phosphate. Il ne peut donc, à plus forte raison, y avoir formation d'UDPGal. L'inducteur commun de ces deux enzymes, ainsi que de la galactose-perméase dans cette souche est, par conséquent, le galactose libre.

D'autre part, il paraît hautement vraisemblable que le galactose doit également, chez les souches portant l'allèle G_1 , être l'inducteur de la galactokinase, dont il est le substrat.

Ces résultats m'ont amenée à formuler l'hypothèse de l'« induction simultanée⁽¹⁾ des enzymes du métabolisme du galactose (de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957), le galactose étant considéré comme l'inducteur polyvalent de toutes les enzymes assurant son métabolisme.

Ceci ne signifie pas que, dans les conditions où les enzymes du métabolisme du galactose exercent leur activité, cette induction ne puisse être renforcée par la présence du substrat de l'enzyme. Les légères différences existant entre les cinétiques d'induction des diverses enzymes, chez CH-1 et chez 1235/2b, pourraient être expliquées de cette manière. Mais il n'en reste pas moins que la molécule du galactose possède à elle seule toute l'information nécessaire à l'induction des quatre enzymes. Les rapports de ce mode d'induction avec le concept plus général de la « répression enzymatique » seront discutées plus loin (voir 7.).

⁽¹⁾ Le terme d'« induction simultanée » avait été par erreur employé par STANIER.(1950) dans le sens d'« induction séquentielle ». Ce terme doit être compris ici dans le sens d'induction polyvalente ou pléiotrope.

3) *Induction des enzymes du métabolisme du galactose chez la souche 1238/5d.*

Les expériences d'adaptation effectuées à l'aide du mutant de génotype $G_1g_2G_3$, galactose-perméase-négatif, montrent que l'induction des enzymes du métabolisme du galactose peut avoir lieu en absence de la galactose-perméase. Toutefois, la concentration de galactose requise est, au moins dans certains cas, supérieure à celle qui induit les enzymes de la souche de génotype $g_1G_2G_3$. La concentration du galactose intracellulaire serait ainsi l'un des facteurs déterminants de l'induction.

L'étude des cinétiques d'induction des différentes enzymes (au sein des différents génotypes), en présence de concentrations variées de galactose, permettrait de se faire une idée plus exacte de la concentration minimum capable de provoquer la biosynthèse induite des enzymes considérées, et de mesurer ainsi l'« affinité » entre le galactose et le (ou les) site(s) de biosynthèse de ces enzymes.

4) *Comparaison des cinétiques d'induction.*

Les cinétiques d'induction de la capacité de concentrer le galactose sont très différentes selon le génotype des souches. La galactose-perméase est synthétisée d'une manière à peu près linéaire chez la souche 1235/2b ($g_1G_2G_3$) galactokinase négative. Au contraire, l'augmentation de la perméabilité envers le galactose chez CH-1 qui, rappelons-le, correspond à la combinaison de l'action de la perméase et des enzymes du métabolisme du galactose et conduit à l'accumulation de « tréhalose », revêt la forme d'une courbe en S.

On peut se demander s'il est possible d'interpréter ces différentes cinétiques sur la base d'un métabolisme énergétique différent. En effet, dans une cellule incapable de métaboliser le galactose (1235/2b), la galactose-perméase se forme linéairement, une telle cellule ne disposant que d'une source énergétique d'origine endogène, à débit constant. Par contre, dans une cellule potentiellement capable de métaboliser le galactose (CH-1), toute induction de la galactose-perméase entraîne l'induction et le fonctionnement des enzymes du métabolisme du galactose. Il en résulte donc un apport énergétique croissant qui pourrait permettre une synthèse exponentielle de la galactose-perméase.

Ceci peut être rapproché des observations de SPIEGELMAN et coll. (1950) montrant également une courbe exponentielle pour l'induction de la « galactozymase » chez les souches portant le caractère « slow » (allèle g_3). Comme il a été suggéré dans la discussion du chapitre précédent, on pourrait penser que l'induction de la galactose perméase, chez les souches portant l'allèle g_3 , est particulièrement lente à cause d'une limitation énergétique importante. Il suffirait donc que l'apport énergétique nécessaire à la biosynthèse de la galactose-perméase soit plus important que celui nécessaire à la synthèse des enzymes métaboliques, pour expliquer l'aspect autocatalytique du phénomène. S'il en était ainsi, il ne serait même pas nécessaire que la réaction contrôlée par le gène g_3 ait un rapport direct avec les enzymes du métabolisme du galactose. Elle pourrait, par exemple, concerner un métabolisme endogène extrêmement réduit, auquel cas toute la biosynthèse induite des enzymes serait dépendante de l'énergie apportée par l'acquisition de la première molécule de perméase, et se prolongerait ensuite auto-catalytiquement. Cette interprétation est en accord avec celle proposée par POLLOCK (1959).

Une autre interprétation plus spécifique du phénomène est cependant concevable, interprétation qui sera présentée au cours de la discussion finale (cf. 7.).

5) *Phase de latence précédant l'adaptation.*

Certaines expériences présentées au cours de ce chapitre ont montré que la durée de la phase de latence peut être considérablement réduite par l'apport de petites quantités de glucose, et qu'il existe une relation très nette entre l'importance de cette réduction et la quantité de glucose ajoutée (entre 1 et 25 μ moles). Ces expériences montrent, par conséquent, que la quantité d'énergie disponible pour les synthèses représente un facteur important dans la durée du temps de latence.

Le fait que des sources de carbone autres que le glucose (lactate, acétate, glycérol), bien que permettant d'assurer des QO_2 au moins égaux à ceux obtenus avec des quantités de glucose aussi petites que 1 μ mole, restent néanmoins sans effet, indique que le rôle du glucose dans la diminution de la période de latence n'est pas exclusivement d'ordre énergétique. Il est assez tentant de penser que la phase de latence pourrait correspondre, soit à l'accumulation, soit à l'élimination, de composés permettant, ou inhibant, la biosynthèse induite des protéines : le glucose ou un métabolite provenant du glucose, aurait un effet stimulateur sur ce processus.

Ces observations peuvent être rapprochées du phénomène d'« adaptabilité » des levures anaérobies (SLONIMSKI, 1956) et du fait que certains composés dérivés des sucres permettent de modifier considérablement la capacité de former les enzymes respiratoires (SLONIMSKI et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957 ; SLONIMSKI, ASSELINEAU et LEDERER, 1959).

6) *Contrôle exercé par le tryptophane sur la cinétique d'induction.*

Il a été montré au cours de ce chapitre que le fait qu'un acide aminé soit indispensable à la croissance peut être utilisé pour contrôler le taux de biosynthèse de plusieurs enzymes inductibles chez la levure. Deux systèmes enzymatiques ont été comparés : les enzymes de la respiration terminale, et les enzymes du métabolisme du galactose.

Cette étude a été effectuée en suivant l'évolution du QO_2 -glucose ou -galactose, de levures aérobies ou anaérobies.

Rappelons qu'il a été montré (SLONIMSKI, 1956) qu'une corrélation satisfaisante existe entre les QO_2 -glucose et la teneur en cytochrome-oxydase, chez la levure. D'autre part, les expériences présentées ici ont permis de mettre en évidence la corrélation existant entre les QO_2 -galactose et les quantités de galactose-perméase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et UDPGal-4-épimérase, présentes.

Il ne peut cependant pas être exclu qu'au cours du processus d'adaptation, de faibles variations dans les vitesses respectives de biosynthèse suffisent à rendre limitante, tantôt l'une, tantôt l'autre, de ces enzymes. Les résultats obtenus représentent par conséquent, soit une valeur moyenne de fluctuations internes, soit la valeur minimum imprimée par l'enzyme limitante à l'activité de chaque système. Il n'en reste pas moins un parallélisme évident dans les effets de la concentration en tryptophane sur les vitesses de biosynthèse de chacun de ces deux systèmes et qui doit donc s'appliquer, soit à l'enzyme qui, dans chaque cas, est limitante, soit à l'ensemble des composants des deux systèmes.

Ces expériences montrent donc que, dans les conditions expérimentales employées (absence de croissance, absence d'une source d'énergie exogène, etc.) il n'y a pas lieu d'admettre une synthèse préférentielle des enzymes de l'un des systèmes par rapport à l'autre.

Il est intéressant de remarquer que, quelles que soient les conditions dans lesquelles la biosynthèse des enzymes étudiées s'effectue, celle-ci est toujours représentée par une droite. C'est ce à quoi l'on devrait s'attendre si l'a concentration intracellulaire en tryptophane constitue, dans ces conditions, le facteur limitant de l'activité des « sites formateurs d'enzymes ». Au contraire, l'augmentation du nombre de « sites formateurs d'enzymes » devrait conduire à une cinétique de second ordre. Cette limitation est la même (ou tout au moins du même ordre de grandeur) pour des sites correspondant à des protéines différentes (voir aussi discussion générale).

Il est évident que cet artifice expérimental peut être mis à profit dans l'étude d'autres paramètres concernant la biosynthèse induite des protéines.

7) *Spécificité de l'induction.*

Il a été mentionné au cours de ce chapitre que, de tous les composés essayés, seul le D-galactose s'était révélé être un inducteur exogène des enzymes de son métabolisme. La signification de l'induction simultanée des enzymes du métabolisme du galactose a été discutée précédemment.

L'induction de l'UDPGal-4-épimérase pose d'une manière très précise le problème de la spécificité de l'induction. En effet, l'UDPG est un substrat de l'UDPGal-4-épimérase, au même titre que l'UDPGal (l'équilibre de la réaction étant 1-UDPGal pour 3-UDPG) et les levures contiennent toujours de l'UDPG en quantité relativement importante (cf. LÉLOIR, 1951). Cependant l'UDPG, bien que substrat, n'est pas un inducteur de l'UDPGal-4-épimérase, chez la levure. Par contre, la formation de cette enzyme est induite par le galactose libre qui n'en est pas un substrat. La molécule du galactose possède donc à elle seule l'« information » nécessaire à l'induction de cette enzyme, information qui est contenue probablement aussi dans la molécule du substrat UDPGal, mais est absente de la molécule du substrat UDPG.

Cette observation est à rapprocher des expériences concernant la réaction d'isomérisation L-Ribulose-5P $\rightleftharpoons$ D-xylulose-5-P (cf. BURMA et HORECKER, 1958 ; WOLIN et coll., 1958). Cette isomérisation, intéressant aussi le quatrième hydroxyle, n'est apparemment induite que par le ribulose.

8) *Variation de la teneur en enzymes, en rapport avec le mode de culture ou d'induction.*

Il est remarquable qu'au cours de l'adaptation aérobie au galactose, les points d'inflexion des différentes courbes se situent à peu près au même moment, comme si la cellule, ayant atteint la quantité d'enzymes nécessaire à une respiration optimum, cessait immédiatement de les fabriquer.

Cette observation est confirmée par l'ensemble des dosages d'enzymes qui ont été effectués au cours de ce travail. Il a été montré que, après induction (ou culture) en aérobiose et en présence de galactose, la quantité d'enzymes du galactose synthétisées atteint une valeur qui ensuite reste constante. La concentration d'enzymes atteinte est apparemment suffisante pour assurer un QO_2 optimum (identique à celui obtenu sur glucose), mais ne permet pas la fermentation du galactose à un taux opti-

mum (les $Q_{CO_2}^{N_2}$ atteints par de telles cultures représentant au maximum 50 p. 100 de la capacité fermentaire sur glucose).

Ce n'est qu'après culture en anaérobiose sur galactose, qu'il est possible d'atteindre des valeurs optima pour la fermentation anaérobie du galactose. Parallèlement, on constate que l'accroissement de la capacité fermentaire vis-à-vis du galactose correspond à l'acquisition d'une quantité d'enzymes du galactose proportionnellement supérieure aux valeurs atteintes en aérobiose.

Une restriction doit être faite à ce schéma en ce qui concerne l'UDPGal 4-épi-mérase, dont la valeur maximum semble déjà être atteinte en aérobiose.

La phosphoglucomutase, par contre, élément constant du métabolisme des hydrates de carbone, varie parallèlement aux enzymes du métabolisme du galactose, au cours du passage galactose-AE, galactose ANA.

La phosphoglucomutase apparaît donc ici comme une enzyme dont la biosynthèse peut, dans certaines conditions, être soumise à des mécanismes intracellulaires de régulation qui permettent à une cellule, placée dans des conditions définies, d'ajuster son équipement enzymatique aux exigences des conditions extérieures. Ce point sera repris au cours de la discussion finale.

RÉSUMÉ

1° Le caractère adaptatif des quatre enzymes du métabolisme du galactose, chez *S. cerevisiae* et *S. fragilis*, a été mis en évidence. La quantité d'enzymes présente dans les cellules non-induites est, dans tous les cas, inférieure à 1 p. 100 de la quantité présente dans les cellules induites.

2° Les concentrations de galactose capables d'induire, et les cinétiques d'induction des différentes enzymes, ont été comparées, entre elles, et avec l'évolution de la capacité de respirer le galactose. Une corrélation satisfaisante a été mise en évidence concernant la galactose-perméase, la Gal-1-P /G-1-P uridyltransférase, l'UDPGal-4-épi-mérase et le QO_2 -galactose, chez la souche CH-1.

3° L'induction des enzymes du métabolisme du galactose, chez la souche galactokinase-négative, a conduit à considérer le galactose comme l'inducteur polyvalent des quatre enzymes et à formuler l'hypothèse d'une « induction simultanée » de ces enzymes.

4° La spécificité du galactose en tant qu'inducteur a été mise en évidence.

5° Les caractéristiques de l'induction chez la souche galactose-perméase-négative, ont conduit à supposer que l'induction de la galactose-perméase pouvait être mise en relation avec un apport énergétique généralement limitant. Ceci pourrait expliquer la cinétique autocatalytique de l'induction de la « galactozymase » chez les souches portant l'allèle g_3 .

6° La durée de la phase de latence peut être réduite par un apport énergétique, sous forme de petites quantités de glucose. La signification de ces résultats a été discutée.

7° Il a pu être montré que, dans certaines conditions, la vitesse de l'adaptation enzymatique est modifiée, en fonction de la quantité de tryptophane ajoutée. Deux systèmes inductibles indépendants ont été comparés : enzymes de la respiration terminale, enzymes du métabolisme du galactose. Les vitesses de biosynthèse de ces

deux systèmes sont influencées de la même façon par la limitation en tryptophane, montrant ainsi l'absence de biosynthèse préférentielle, dans ces conditions.

8° La teneur en enzymes du métabolisme du galactose a été étudiée, en fonction du mode de culture ou d'induction. Il a pu être montré que le contenu enzymatique intracellulaire s'ajuste à des valeurs caractéristiques, selon que les levures sont adaptées à la respiration ou à la fermentation en présence de galactose.

La signification de ces résultats, en ce qui concerne les mécanismes de régulation métaboliques, a été discutée.

VII. — REMARQUES SUR LE CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DE LA FORMATION DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ *S. CEREVISIAE*

La plupart des résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail ont été discutés en détail à la fin de chacun des trois chapitres principaux (voir 4.5, 5.4, et 6.10). Cette discussion finale sera consacrée à l'examen de quelques points particuliers concernant le mécanisme de l'induction des enzymes du métabolisme du galactose et son contrôle génétique, chez *S. cerevisiae*.

Il a été montré que l'utilisation du galactose chez la levure suit la même voie métabolique que celle qui a été décrite chez *E. coli* et chez l'homme (*cf.* KALCKAR et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1959), et dont le résultat est l'épimérisation du galactose en glucose. Cette transformation s'opère sur des composés uridyliques de ces deux sucres et requiert l'intervention de 4 enzymes spécifiques. Trois de ces enzymes catalysent des transformations chimiques proprement dites ; ce sont : la galactokinase, la Gal-1-P /G-1-P uridyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase. Une quatrième enzyme, la galactose-perméase, mise en évidence au cours de ce travail, catalyse le transport actif du galactose et sa concentration à l'intérieur de la cellule.

On connaît jusqu'à maintenant trois gènes non liés (*cf.* HAWTHORNE, 1956) G_1 , G_2 , G_3 qui interviennent dans le contrôle du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae*. Il ressort des expériences qui ont été présentées ici que le gène G_2 contrôle la formation de la galactose-perméase, et que le gène G_1 contrôle celle de la galactokinase. Le rôle du gène G_3 n'a pas été précisé, mais il ne semble pas exercer un contrôle direct sur la capacité de former l'une quelconque des enzymes du métabolisme du galactose. Je reviendrai plus loin sur ce point.

Il a été montré également que les quatre enzymes du métabolisme du galactose sont inductibles. Les modalités de l'induction de ces enzymes dans différentes conditions (aérobiose, anaérobiose, cellules non-proliférantes ou cellules en croissance, etc.) ont été définies. La formation des enzymes du métabolisme du galactose est extrêmement réduite en absence de tryptophane exogène (nécessaire à la croissance de la souche utilisée) ce qui a permis de conclure que l'adaptation des levures à l'utilisation du galactose correspond à une biosynthèse induite des enzymes assurant le métabolisme de ce sucre. En présence de quantités limitantes de tryptophane il n'a pas été observé de synthèse protéique préférentielle : la biosynthèse de deux systèmes inductibles (enzymes de la respiration terminale et enzymes du métabolisme du galactose) est limitée de la même manière par les mêmes concentrations de tryptophane. Ces résultats montrent que la présence d'un facteur limitant de la synthèse protéique

limite l'activité des « sites formateurs d'enzymes » et ne semble pas en modifier le nombre (*cf.* 5.6).

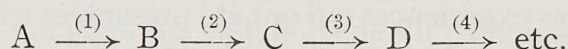
On voit que le présent travail a permis d'apporter un nouvel exemple d'une chaîne métabolique composée de quatre enzymes, toutes inductibles, et de définir avec précision certaines des caractéristiques de leur biosynthèse induite.

Les connaissances acquises au cours de cette étude, en ce qui concerne les propriétés biochimiques et adaptatives de ces enzymes et le contrôle héréditaire de leur biosynthèse chez *S. cerevisiae*, permettent maintenant d'envisager une étude génétique plus approfondie. Il est intéressant, en particulier, de connaître la nature du contrôle exercé par les gènes déjà connus (G_1 et G_2) sur la biosynthèse des deux enzymes impliquées, galactokinase et galactose-perméase, et le mode d'action du gène G_3 . Il serait également important de caractériser les gènes qui doivent vraisemblablement assurer le contrôle de la biosynthèse des deux autres enzymes, Gal-I-P/G-I-P uridylyltransférase et UDPGal-4-épimérase pour lesquelles aucun mutant n'a jusqu'à présent été trouvé chez la levure.

L'étude de ce système présente de nombreux avantages : non seulement les quatre enzymes qui le composent sont inductibles, mais trois d'entre elles sont solubles et peuvent être dosées spectrophotométriquement par des méthodes sensibles et spécifiques. De plus, l'UDPGal-4-épimérase possède la propriété d'être fluorescente, propriété qui peut être dissociée de son activité enzymatique. L'obtention de mutants concernant la biosynthèse de cette enzyme devrait donc permettre l'étude de mutations ne modifiant que l'une des caractéristiques de cette protéine (fluorescence ou activité enzymatique).

Il est évident, d'autre part, que l'étude de ce système chez *S. cerevisiae* permet d'analyser d'une manière précise la ségrégation et les inter-actions des caractères envisagés.

L'étude de l'inductibilité des différentes enzymes du métabolisme du galactose, à l'aide des mutants qui ne métabolisent pas ce sucre, a permis de mettre en évidence un phénomène nouveau concernant le mécanisme d'induction de ces enzymes. Rappelons que selon le schéma de STANIER (1950) :



dans lequel A, B, C, D sont les substrats successifs d'une série d'enzymes (1), (2), (3), (4), le produit A est l'inducteur de l'enzyme (1), B l'inducteur de l'enzyme (2), etc. En l'absence de l'enzyme (1), le produit B n'étant pas formé, les enzymes (2), (3) et (4) ne devraient pas être induites. Cependant, chez le mutant galactokinase-négatif, les deux enzymes Gal-I-P/G-I-P uridylyltransférase et UDPGal-4-épimérase, sont induites en présence de galactose, bien que ce mutant ne forme ni galactose-I-phosphate, ni UDPGal (voir 5.2). Le galactose doit donc être considéré ici comme l'inducteur polyvalent de toutes les enzymes de cette chaîne métabolique⁽¹⁾. Ce mécanisme d'induction a été appelé « induction simultanée » (*cf.* 6.5 et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957).

Cette conception est à rapprocher de la théorie actuelle de la « répression enzymatique » qui a déjà été évoquée au cours de l'introduction du chapitre 6.

⁽¹⁾ Le galactose est donc, par conséquent, l'inducteur « gratuit » d'au moins deux des enzymes du métabolisme du galactose, la Gal-I-P/G-I-P uridylyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase, selon le mécanisme décrit par MONOD et COHN (1952).

On sait, en effet, que la synthèse de certaines enzymes dites « constitutives » peut être inhibée sélectivement par la présence de « répresseurs exogènes ». Dans les exemples connus jusqu'à présent, un seul répresseur, le produit final de la chaîne métabolique ou un analogue structural de ce dernier, est capable de réprimer la biosynthèse de toutes les enzymes de cette chaîne (*cf.* MAGASANIK, 1959 pour revue). De même que dans le cas de l'induction simultanée des enzymes du métabolisme du galactose, il a pu être montré que la répression des enzymes de l'un de ces systèmes est indépendante de la présence d'un « bloc » génétique (GORINI et MAAS, 1957).

On sait, d'autre part, que l'action du répresseur exogène ne s'exerce qu'en présence d'un « gène répresseur » et que la mutation de ce gène affecte simultanément le caractère « inductible » ou « répressible » de l'ensemble des enzymes d'une chaîne métabolique (*cf.* JACOB et MONOD, 1959).

Il semble donc qu'un seul « répresseur endogène » (supposé être présent dans les souches inductibles, ou formé à partir du répresseur exogène chez les souches réprimées) peut bloquer le (ou les) site (s) de biosynthèse des enzymes appartenant à une même chaîne métabolique. Si l'on admet que l'inducteur agit en déplaçant le répresseur de ce (ou de ces) site (s), une seule espèce moléculaire d'inducteur par espèce moléculaire de répresseur doit donc être nécessaire.

L'inductibilité de plusieurs enzymes par un inducteur unique pourrait, par conséquent, être l'indication de la présence d'un système de « répression simultanée ».

Dans le cadre des travaux récents, concernant le contrôle génétique de la biosynthèse des enzymes (*cf.* JACOB et MONOD, 1959 et JACOB et coll., 1960), il est intéressant d'essayer de prévoir la nature possible du rôle des gènes déjà connus qui interviennent dans le déterminisme héréditaire de la capacité de métaboliser le galactose chez *S. cerevisiae*.

Je rappellerai tout d'abord, d'une manière très schématique, l'essentiel des résultats acquis par les auteurs précédemment cités, chez *E. coli* et sur des systèmes étroitement liés :

Une unité opérationnelle responsable de la biosynthèse des enzymes d'une chaîne métabolique (« opéron ») comprend une série de gènes responsables, chacun, de la synthèse de l'une des enzymes de la chaîne (« gènes structuraux ») dont l'activité est contrôlée par un seul « gène opérateur » et un « gène répresseur ». Les gènes structuraux et le gène opérateur correspondant sont étroitement liés, tandis que le gène répresseur peut ne pas être lié. Ce dernier gène est supposé être responsable de la synthèse d'une substance spécifique le « répresseur endogène » qui, en présence du répresseur exogène, est capable d'empêcher l'action du gène opérateur.

La formation des enzymes repressibles serait rendue possible, soit par l'abaissement de la concentration en répresseur (« dé-répression métabolique »), soit par une mutation affectant le gène répresseur ou le gène opérateur (« dé-répression génétique »). En effet, une mutation affectant la capacité de former le répresseur endogène conduit à la synthèse d'enzyme, même en présence du répresseur exogène. Ces mutants « constitutifs » sont de caractère récessif (*cf.* PARDEE, JACOB et MONOD, 1958). Une mutation provoquant l'insensibilité du gène opérateur envers le répresseur conduit également à une synthèse constitutive d'enzyme, laquelle est, cette fois, de caractère dominant (*cf.* JACOB et MONOD, 1959 ; JACOB et coll. 1960).

La formation des enzymes inductibles serait, de plus, soumise à la présence d'un inducteur capable d'antagoniser l'action du répresseur.

Les considérations qui vont suivre seront basées sur les faits expérimentaux qui viennent d'être résumés et seront étendues aux systèmes de la levure pour lesquels la plupart des enzymes constituant des séquences métaboliques ne sont pas liées génétiquement. La validité de cette extension est évidemment discutable. Elle permet toutefois de formuler un certain nombre d'hypothèses qui peuvent être soumises à vérification expérimentale.

En ce qui concerne les gènes impliqués dans le contrôle génétique du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae*, les caractéristiques des souches portant les allèles g_1 ou g_2 semblent correspondre à des mutations de gènes de structure $S \rightarrow s$ (protéine non-formée ou inactive). En effet, une seule enzyme est absente dans chaque génotype muté, et la synthèse des autres enzymes de la chaîne métabolique du galactose n'est apparemment pas perturbée.

Le cas du gène G_3 semble être différent. En effet, comme il a été montré au cours de ce travail, les quatre enzymes du métabolisme du galactose sont présentes, après induction, dans les souches portant l'allèle g_3 . Seule la cinétique d'induction semble donc être modifiée (caractère « slow », cf. 6.1).

Le mode d'adaptation des souches portant l'allèle récessif g_3 pourrait être attribué à un phénotype « super-réprimé ⁽¹⁾ ». Un tel phénotype peut à priori, être dû à deux événements génétiques différents : — a) mutation d'un gène hypothétique « R » qui forme une plus grande quantité de répresseur, ou un répresseur plus actif ; — b) mutation d'une structure génétique hypothétique du type « gène-opérateur » que j'appellerai « O », qui est devenu plus sensible au répresseur.

TABLEAU 22

Mutations pouvant affecter les systèmes génétiques qui contrôlent la biosynthèse des protéines

Gène muté	Nature de la mutation	Génotype résultant	Phénotype	Caractère
—	—	ROS	réprimé ou inductible	—
R (répresseur)	r (inactif) R^2 (plus actif)	r OS R^2 OS	constitutif super-réprimé	récessif dominant
O (opérateur)	O_c (insensible à R) O_r (plus sensible à R)	RO_c S RO_r S	constitutif super-réprimé	dominant récessif
S (structure)	s (protéine inactive) S_m (protéine formée même en présence de O + R) S_c (ne répond plus à O)	RO_s ROS_m ROS_c	négatif constitutif négatif	récessif dominant récessif

Le tableau 22 résume les différents types de mutations auxquelles on peut s'attendre au sein d'un système complexe « R-O-S ». On voit que la mutation $R \rightarrow R_2$ doit conduire à un phénotype super-réprimé de caractère dominant, tandis que la mutation $O \rightarrow O_r$ doit conduire à un phénotype super-réprimé de caractère récessif. Or, il est connu que le caractère « slow » correspondant à l'allèle g_3 (ancien G_s) est

⁽¹⁾ Il a été suggéré précédemment (voir 5.4. et 6.10) que l'aspect autocatalytique du phénomène pourrait également être expliqué par une limitation énergétique au niveau de la biosynthèse de la galactose-perméase.

récessif par rapport à G_3 . Il en résulte donc que si l'existence d'un système tel qu'on vient de le décrire doit être postulée dans le cas du contrôle génétique des enzymes du métabolisme du galactose, la mutation $G_3 \rightarrow g_3$ devrait donc être le résultat d'une mutation d'une structure génétique « O » et non du gène répresseur correspondant.

Il a déjà été signalé à plusieurs reprises que les gènes G_1 , G_2 et G_3 ne sont pas liés (cf. DOUGLAS et CONDIE, 1951 ; HAWTHORNE, 1956). De plus, des travaux récents de DOUGLAS (1960) ont permis de caractériser huit loci indépendants intervenant dans la capacité d'utiliser le galactose chez *S. cerevisiae*. La localisation génétique de certains d'entre eux a permis de montrer que G_1 , G_3 , G_4 et probablement G_5 sont situés sur des chromosomes différents (HAWTHORNE, expériences non publiées). Le rôle biochimique des gènes G_4 ... G_8 n'a pas encore été étudié.

On peut évidemment se poser plusieurs questions concernant un tel système : — 1° Existe-t-il des gènes « O » contrôlant des gènes structuraux indépendants ? — 2° Si oui, existe-t-il un seul gène « O » pour l'ensemble des gènes correspondant à une chaîne métabolique, malgré la dispersion du matériel génétique, ou bien devra-t-on invoquer un complexe « O-R » distinct pour chaque gène indépendant ?

Il est évident que la réponse à ces questions exige l'accumulation d'un plus grand nombre de mutants dans ce système, mutants structuraux, d'une part, correspondant aux deux autres enzymes du galactose, la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase, dont la localisation génétique n'est pas connue, mutants constitutifs ou super-réprimés, d'autre part, correspondant aux différentes catégories prévisibles (voir tableau 22). Si le raisonnement « un inducteur — un répresseur » qui a été développé précédemment est valable, on pourrait s'attendre à trouver un seul complexe « O-R » pour l'ensemble du système galactose chez *S. cerevisiae*.

En dehors des caractéristiques principales concernant l'induction des différentes enzymes du métabolisme du galactose, chez *S. cerevisiae*, ce travail a fait ressortir la présence d'un système de régulation métabolique au niveau de l'une des enzymes-clé du métabolisme des glucides, la phosphoglucomutase.

On a vu qu'une teneur plus élevée en enzymes du galactose (cellules adaptées, cultivées en anaérobiose sur galactose), correspondant probablement à un apport plus important en glucose-1-phosphate, entraîne un accroissement d'environ trois fois, de la quantité de phosphoglucomutase présente normalement dans les cellules cultivées en présence de glucose. Le potentiel de synthèse de la phosphoglucomutase n'est donc pas totalement exprimé dans les cellules qui prolifèrent sur glucose.

La phosphoglucomutase n'est pas seulement indispensable à l'utilisation finale du glucose provenant de l'isomérisation du galactose. Elle se trouve également sur toutes les voies métaboliques qui conduisent à la formation de réserves hydrocarbonées. Un système de régulation métabolique s'exerçant au niveau de la phosphoglucomutase permettrait donc d'assurer un équilibre dynamique entre la formation de réserves hydracarbonées et l'utilisation à des fins énergétiques des hydrates de carbone.

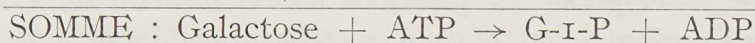
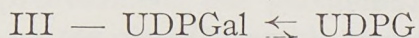
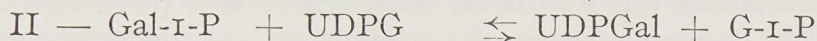
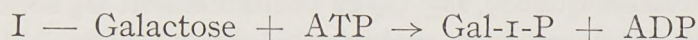
Les différents niveaux stables qui peuvent être atteints (selon les conditions de culture ou d'induction) aussi bien pour les enzymes du métabolisme du galactose que pour la phosphoglucomutase, montrent bien qu'il s'agit, à chaque fois, d'un équilibre interne dû à des rapports d'ordre quantitatif, probablement entre inducteur et répresseur.

VIII. — RÉSUMÉ GÉNÉRAL

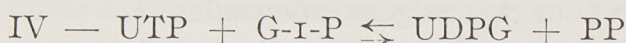
L'étude chez les levures, et plus particulièrement chez *S. cerevisiae*, du métabolisme du galactose, de son contrôle héréditaire, et de la biosynthèse induite des enzymes impliquées dans ce métabolisme, a fait l'objet de ce travail :

Les principaux résultats acquis sont les suivants :

1° L'utilisation du galactose par *S. cerevisiae* et *S. fragilis* s'effectue par la voie métabolique de LÉLOIR-KALCKAR selon les réactions :



L'UDPG nécessaire à l'amorçage du système est formé au cours de la réaction suivante :



2° Les enzymes catalysant les réactions I, II et III sont présentes chez les levures adaptées au galactose, et absentes des levures non-adaptées. L'enzyme catalysant la réaction IV est au contraire toujours présente. Cette enzyme, G-I-P/PP uridyltransférase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase dont la concentration intracellulaire varie peu, ont été choisies comme enzymes de référence.

3° L'enzyme catalysant la réaction III, UDPGal-4-épimérase, a été purifiée 150 fois. L'enzyme native possède un spectre de fluorescence, et, contrairement à la même enzyme extraite de foie de mammifère, fonctionne sans addition de DPN. Toutefois, après différents traitements qui font disparaître la fluorescence, l'enzyme traitée exige l'addition de DPN pour son fonctionnement. Le composé lié à l'enzyme et responsable de sa fluorescence a été identifié au DPN.

4° Un schéma a été proposé permettant d'expliquer le mécanisme de la réaction d'épimérisation $\text{UDPGal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$, sur la base d'un nouveau mécanisme d'oxydo-réduction dans lequel le noyau de l'uracile et le DPN acceptent conjointement un atome d'hydrogène du substrat, tandis qu'une compensation de charge se produit entre les deux noyaux.

5° Un système catalysant le transport actif du galactose et sa concentration à l'intérieur de la cellule est présent chez les levures adaptées ($g_1g_2g_3$). Les principales propriétés de ce système ont été décrites.

6° Trois gènes, actuellement identifiés, contrôlent le métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae* : G_1 , G_2 , G_3 . Le gène G_1 contrôle la formation de la galactokinase, tandis que le gène G_2 contrôle celle de la galactose-perméase, précédemment décrite. Bien que le mode d'action du gène G_3 n'ait pas été précisé, certaines indications quant à son rôle possible ont été apportées et discutées.

7° Les cinétiques d'induction des différentes enzymes du métabolisme du galactose ont été comparées. Quelques-uns des paramètres de l'induction de ces enzymes ont été étudiés. Il a été montré que la formation des enzymes du métabolisme du galactose, chez *S. cerevisiae*, correspond, très vraisemblablement, à une synthèse *de novo* de ces protéines.

8° En présence de quantités limitantes de tryptophane (nécessaire à la croissance de la souche utilisée), la synthèse de deux systèmes inductibles différents a été comparée : enzymes de la respiration terminale, enzymes du métabolisme du galactose. Il n'a pas été observé de synthèse préférentielle de l'un des systèmes par rapport à l'autre. La signification de ces résultats a été discutée.

9° L'induction par le galactose des enzymes de son métabolisme, chez les souches galactokinase-négatives, a permis de mettre en évidence un phénomène d'*induction simultanée*. Les implications de ce phénomène, en ce qui concerne le mécanisme général de l'induction et de la répression ont été dégagées.

10° La teneur des cellules de levure en phosphoglucomutase peut être considérablement augmentée dans certaines conditions. L'importance métabolique de l'existence d'un système de régulation au niveau de la phosphoglucomutase a été discutée.

11° Quelques déductions ou prédictions concernant la nature du contrôle exercé par les gènes sur la biosynthèse des enzymes du métabolisme du galactose chez les levures, ont été présentées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON L., LANDEL A. M. et DIEDRICH D. F., 1956. The galactose-glucose conversion in isotopic water. *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 573-575.
- ANET E. F. et REYNOLDS T. M., 1953. Isolation of 1-quinic acid from the peach-fruit. *Nature*, **172**, 1188-1189.
- BATESON W., 1909. « *Mendel's principles of heredity* », Cambridge Univ. Press, London.
- BEADLE G. W. et EPHRUSSI B., 1936. The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation. *Genetics*, **21**, 225-247.
- BEADLE G. W. et EPHRUSSI B., 1937. Developement of eye colors in *Drosophila* : diffusible substances and their interrelations. *Genetics*, **22**, 76-86.
- BEADLE G. W., 1945. Biochemical genetics. *Chem. Rev.* **37**, 15-96.
- BOYER P. D. et THEORELL H., 1956. The change in reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH) fluorescence upon combination with liver alcohol dehydrogenase (ADH). *Acta Chem. Scand.*, **10**, 447-450.
- BOWMAN R. L., CAUFIELD P. A., et UDENFRIEND S., 1955. Spectrofluorometric assay in the visible and ultra-violet. *Science*, **122**, 32-33.
- BRITTEN R. J., ROBERTS R. B. et FRENCH E. F., 1955. Amino acid adsorption and protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **41**, 863-870.
- BURGER M., HEJMOVA L. et KLEINZELLER A., 1959. Transport of some mono and di-saccharides into yeast cells. *Biochem. J.*, **71**, 233-242.
- BURMA D. P. et HORECKER B. L., 1958. Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. IV : L-Ribulose-5-phosphate 4-epimerase. *J. Biol. Chem.*, **231**, 1053-1064.
- BURTON R. M., SODD M. A. et BRADY R. O., 1957. Incorporation of galactose into galactolipids of brain tissue. *Fed. Proc.*, **16**, 161.
- CABIB E., LELOIR L. F. et CARDINI C. E., 1953. Uridine diphosphate acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, **203**, 1055-1070.
- CABIB E. et LELOIR L. F., 1954. Guanosine diphosphate mannose. *J. Biol. Chem.*, **206**, 779-790.
- CAMPBELL A. M. et SPIEGELMAN S., 1956. The growth kinetics of elements necessary for galactozymase formation in « long-term adapting » yeasts. *C. R. Lab. Carlsberg, sér. physiol.*, **26**, 13-30.
- CAPUTTO R., LELOIR L. F., CARDINI C. E. et PALADINI A. C., 1950. Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem.*, **184**, 333-350.
- CARDINI C. E., LELOIR L. F. et CHIBIBOGA J., 1955. The biosynthesis of sucrose. *J. Biol. Chem.*, **214**, 149-155.
- CIOTTI M. M., et KAPLAN N. O., 1957. Procedures for determination of pyridine nucleotides, in « *Methods in Enzymology* », Acad. Press, **3**, 890-899.
- COHEN G. N. et RICKENBERG H. V., 1956. Concentration spécifique réversible des aminoacides chez *Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 693-720.
- COHEN G. N. et MONOD J., 1957. Bacterial permeases. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 169-194.
- COHEN G. N., et JACOB F., 1959. Sur la répression de la synthèse des enzymes intervenant dans la formation du tryptophane chez *Escherichia coli*. *C. R. Acad. Sc.*, **248**, 3490-3492.
- COHEN-BAZIRE G. et JOLIT M., 1953. Isolement par sélection de mutants d'*Escherichia coli* synthétisant spontanément l'amylomaltase et la β -galactosidase. *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 1-9.
- COHN M., 1957. Contributions of studies on the β -galactosidase of *Escherichia coli* to our understanding of enzyme synthesis. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 140-168.
- COHN M. et MONOD J., 1953., Specific inhibition and induction of bacterial enzyme synthesis, in « *Symp. Adaptation in microorganisms* », Cambridge Univ. Press, 132-149.

- COHN M., et TORRIANI A. M., 1953. The relationships in biosynthesis of the β -galactosidase and Pz-proteins in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 280-289.
- CRAMER F. B., et WOODWARD G. E., 1952. The 2-deoxy-D-glucose as an antagonist of glucose in yeast fermentation. *J. Franklin Inst.*, **253**, 354-360.
- DELEY J. et DOUDOROFF M., 1957. The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.*, **227**, 745-757.
- DIENERT M., 1900. Sur la fermentation du galactose et sur l'accoutumance des levures à ce sucre. *Ann. Inst. Pasteur*, **14**, 139-189.
- DIXON M., 1943. « *Manometric methods* ». 2nd Ed., Mac Millan, New York.
- DOUDOROFF M., 1951. The problem of the « direct utilization » of disaccharides by certain microorganisms in « *Symp. on Phosphorus metabolism* », Mc Elroy W. D. et Glass B. ed., Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 42-47.
- DOUDOROFF M., PALLERONI N. J., MAC GEE J. et O'HARA M., 1956. Metabolism of carbohydrates by *Pseudomonas saccharophila*. I. Oxidation of fructose by intact cells and crude cell-free preparations. *J. Bacteriol.*, **71**, 196-201.
- DOUGLAS H. G. et CONDIE F., 1954. The genetic control of galactose utilization in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.*, **68**, 662-670.
- DOUGLAS H. G., 1960. « *Abstracts from Research and Graduate Training Program in Genetics* ». Univ. of Washington, Seattle.
- DUCLAUX E., 1899. « *Traité de Microbiologie* », Masson ed., Paris.
- DUTTON G. J. et STOREY I. D. E., 1951. Glucuronide synthesis in liver homogenates. *Biochem. J.*, **48**, proc. 29.
- DUYSSENS L. N. M. et KRONENBERG G. H. M., 1957. The fluorescence spectrum of the complex of reduced phosphopyridine nucleotide and alcohol dehydrogenase from yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 437-438.
- EULER H. von et JANSSON B., 1927. The adaptation of fresh culture yeasts to galactose. *Z. Physiol. Chem.*, **169**, 226-234.
- FIESER L. F., et FIESER M., 1950. « *Organic chemistry* », Heath and Co. ed., Boston.
- FISCHER H. O. L., 1944. Chemical and biological relationships between hexoses and inositols. *Harvey Lect.*, **40**, 156.
- FRIDHANDLER L., 1959. Glucose metabolism in rabbit ova, morulae and blastocysts. *Fed. Proc.*, **18**, 48.
- FUKASAWA T. et NIKAIIDO H., 1959. Formation of « protoplasts » in mutant strain of *Salmonella* induced by galactose. *Nature*, **183**, 1131-1132.
- GALZY P., et SLONIMSKI P. P., 1957. Evolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sc.*, **245**, 2556-2558.
- GANDER J. E., PETERSEN W. E. et BOYER P. D., 1956. On the mechanism of enzymatic synthesis of lactose. *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 259-261.
- GARROD A. E., 1909. « *Inborn errors of metabolism* », Oxford.
- GINSBURG V. et NEUFELD E. F., 1957. Inhibition of phosphoglucomutase by galactose-1-phosphate : a possible factor in galactose toxicity. *Abst. Am. Chem. Soc.*, Meeting Sept.
- GINSBURG V., 1958. Formation of guanosine diphosphate fucose from guanosine diphosphate mannose. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4426.
- GORINI L. et MAAS W., 1957. The potential for the formation of a biosynthetic enzyme in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 208-210.
- HALVORSON H. O. et SPIEGELMAN S., 1952. The inhibition of enzyme formation by amino acid analogs. *J. Bacteriol.*, **64**, 207-221.
- HALVORSON H. O. et SPIEGELMAN S., 1953. The effect of free amino acid pool levels on the induced synthesis of enzymes. *J. Bacteriol.*, **65**, 496-504.
- HALVORSON H. O. et SPIEGELMAN S., 1953. Net utilization of free amino acids during the induced synthesis of maltozymase in yeast. *J. Bacteriol.*, **65**, 601-608.
- HALVORSON H. O., SPIEGELMAN S. et HINMAN R. L., 1955. The effect of tryptophan analogs on the induced synthesis of maltase and protein synthesis in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**, 512-525.
- HARDEN A. et NORRIS R. V., 1910. The fermentation of galactose by yeast and yeast juice. *Proc. Roy. Soc. London*, **82**, 645-649.
- HASSID W. Z., PUTMAN E. W. et GINSBURG V., 1956. Metabolism of galactose in *Canna* leaves and wheat seedlings. *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 17-22.
- HAWTHORNE D. C., 1956. The genetics of galactose fermentation in *Saccharomyces* hybrids. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.*, **26**, 149-160.
- HAWTHORNE D. C., expériences non publiées.
- HOAGLAND M. B., 1955. An enzymic mechanism for amino-acid activation in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 288-289.
- HOGNESS D. S., COHN M. et MONOD J., 1955. Studies on the induced synthesis of β -galactosidase in *E. coli*. The kinetics and mechanism of sulfur incorporation. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 99-116.
- HORECKER B. L., 1950. Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome *c* reductase in liver. *J. Biol. Chem.*, **183**, 593-605.
- HUGHES D. E., 1951. A press for disrupting bacteria and other micro-organisms. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **32**, 97-109.
- ISSELBACHER K. J. et AXELROD J., 1955. Enzymatic formation of corticosteroid glucuronides. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1070-1071.
- ISSELBACHER K. J., 1957. Evidence for an accessory pathway of galactose metabolism in mammalian liver. *Science*, **126**, 652-654.
- JACOB F. et MONOD J., 1959. Gènes de structure et gènes de régulation dans la biosynthèse des protéines. *C. R. Acad. Sc.*, **249**, 1282-1284.
- JACOB F., PERRIN D., SANCHEZ C. et MONOD J., 1960. L'OPERON : groupes de gènes à expression coordonnée par un opérateur. *C. R. Acad. Sc.*, **250**, 1727-1729.

- JERMYN M. A. et ISHERWOOD F. A., 1949. Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram. *Biochem. J.*, **44**, 402-407.
- KALCKAR H. M. et CUTOLO E., 1952. Enzymic pyrophosphorolysis of uridine diphosphoglucosyl (UDPG), 1952. 2^{ème} Congr. Intern. Bioch., rés. comm, p. 260.
- KALCKAR H. M., BRAGANCA B. et MUNCH-PETERSEN A., 1953. Uridyltransferases and the formation of uridine diphosphoglucose. *Nature*, **172**, 1039.
- KALCKAR H. M. et MAXWELL E. S., 1956. Some considerations concerning the nature of the enzymic galactose-glucose conversion. *Biochim. Biophys. Acta.*, **22**, 588-589.
- KALCKAR H. M., ANDERSON E. P. et ISSELBACHER K., 1956. Galactosemia, a congenital defect in a nucleotide transferase : a preliminary report. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **42**, 49-51.
- KALCKAR H. M., 1958. Uridine diphospho galactose : metabolism, enzymology and biology. *Adv. Enzymol.*, **20**, 111-134.
- KALCKAR H. M. et de ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1959. Quelques aspects du métabolisme du galactose chez les microorganismes et chez l'homme. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, **41**, 1309-1328.
- KALCKAR H. M., KURAHASHI K. et JORDAN E., 1959. Hereditary defects in galactose metabolism in *Escherichia coli* mutants, I. Determination of enzyme activities. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **45**, 1776-1786.
- KARREMAN G., ISENBERG I. et SZENT-GYORGYI A., 1959. On the mechanism of action of chlorpromazine. *Science*, **130**, 1191-1192.
- KARRER P., 1950. « *Organic chemistry* », Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
- KATTERMAN R. et SLONIMSKI P. P., 1960. Effet différentiel des analogues structuraux d'acides aminés sur la formation des enzymes respiratoires induite par l'oxygène. *C. R. Acad. Sc.*, **250**, 220-221.
- KENNEDY E. P. et WEISS S. B., 1954. Cytidine diphosphate choline : a new intermediate in lecithin biosynthesis. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 250-251.
- KEPES A. et MONOD J., 1957. Étude du fonctionnement de la galactoside perméase. *C. R. Acad. Sc.*, **244**, 809-811.
- KIRKMAN H. N. et BYNUM E., 1959. Enzymic evidence of a galactosemic trait in parents of galactosemic children. *Ann. Human Genetics*, **23**, 117-126.
- KLENOW H. et EMBERLAND R., 1955. The enzymatic reaction between Ribose-1-phosphate and Glucose-1-6 diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 276-287.
- KORNBERG A., 1950. Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **182**, 805-813.
- KOSTERLITZ H. W., 1943. The structure of the galactose-phosphate present in the liver during galactose assimilation. *Biochem. J.*, **37**, 318-321.
- KOWALSKY A. et KOSHLAND jr D. E., 1956. The mechanisms of the galactose-glucose interconversion in *Lactobacillus bulgaricus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **22**, 575-577.
- KURAHASHI K., 1957. Enzyme formation in galactose-negative mutants of *Escherichia coli*. *Science*, **125**, 114-116.
- KURAHASHI K. et ANDERSON E. P., 1958. Galactose-1-phosphate uridyl transferase, its purification and application. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 498-501.
- LEDERBERG J., 1951. Genetic studies with bacteria, in « *Genetics in the 20th century* », Mac Millan ed., New York, p. 263-289.
- LEDERBERG E., 1958. Fine structure of the Gal loci in *E. coli* K12. *Proc. 10th Intern. Congr. Genetics*, **2**, 161.
- LELOIR L. F., 1951a. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 186-190.
- LELOIR L. F., 1951b. The metabolism of hexose phosphates, in « *Phosphorus metabolism* », Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 67-93.
- LELOIR L. F. et CABIB E., 1953. The enzymic synthesis of trehalose phosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5445-5446.
- LELOIR L. F. et CARDINI C. E., 1955. The biosynthesis of sucrose phosphate. *J. Biol. Chem.*, **214**, 157-165.
- LEUPOLD U. et HOTTINGUER H., 1954. Some data on segregation in *Saccharomyces*. *Heredity*, **8**, 243-258.
- LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1943. A new method for hybridizing yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **29**, 306-308.
- LINDEGREN C. C., SPIEGELMAN S. et LINDEGREN G., 1944. Mendelian inheritance of adaptive enzymes in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **30**, 346-352.
- LINDEGREN C. C., 1945. Mendelian and cytoplasmic inheritance in yeasts. *Ann. Mo. Bot. Garden*, **32**, 107-123.
- LINDEGREN C. C., 1946. A new gene theory and an explanation of the phenomenon of dominance to Mendelian segregation of the cytogene, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **32**, 68-70.
- LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1946. The cytogene theory. *Cold Spring Harbor Symp.*, **11**, 115-129.
- LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1947. Mendelian inheritance of genes affecting vitamin synthesizing ability in *Saccharomyces*. *Ann. Mo. Bot. Garden*, **34**, 95-99.
- LINDEGREN C. C., 1949. « *The yeast cell. Its genetics and cytology* », Educ. Pub., St-Louis.
- LINDEGREN C. C. et PALLERONI N. J., 1952. Absence of pre-adaptive utilization of galactose by yeasts. *Nature*, **169**, 879.
- LINDENBERG A. B., MONIQUE A. et GUILLEMET R., 1949. La cryoscopie pratiquée sur le milieu de suspension de la levure et ses applications. *C. R. Acad. Sc.*, **229**, 774-775.
- LINWEAVER H. et BURK D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658.
- LODDER J. et KRIEGER-VAN RIJ N. J. W., 1952. « *The yeasts. A taxonomic study* », Interscience Pub., New York.
- LOEWUS F. A., WESTHEIMER F. H. et VENNESLAND B., 1953. Enzymatic synthesis of the enanthiomorphs of Ethanol-1D-. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5018-5023.

- LOEWUS F. A., VENNESLAND B. et HARRIS D. L., 1955. The site of enzymatic hydrogen transfer in diphosphopyridine nucleotide. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3391-3393.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. et RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MAGASANIK B., MAGASANIK A. K., et NEIDHARDT F. G., 1959. Regulation of growth and composition of the bacterial cell, in « *Regulations of cell metabolism* », Ciba Found. Symp., p. 334-348.
- MANDELSTAM J., 1957. Turn-over of protein in starved bacteria and its relationship to the induced synthesis of enzyme. *Nature*, **179**, 1179.
- MAXWELL E. S., KALCKAR H. M. et BURTON R. M., 1955. Galacto-waldenase and the enzymic incorporation of galactose-1-phosphate in mammalian tissues. *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, p. 168-169.
- MAXWELL E. S., 1956. Diphosphopyridine nucleotide, a cofactor for galacto-waldenase. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 1074.
- MAXWELL E. S., 1957. The enzymic interconversion of uridine diphosphogalactose and uridine diphosphoglucose. *J. Biol. Chem.*, **229**, 139-151.
- MAXWELL E. S., de ROBICHON-SZULMAJSTER H. et KALCKAR H. M., 1958. Yeast uridine diphosphogalactose-4-epimerase, correlation between activity and fluorescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 407-415.
- MAXWELL E. S. et de ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1960. Purification of uridine diphosphate galactose-4-epimerase from yeast, and the identification of protein-bound diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **235**, 308-312.
- MILLS G. T., SMITH E. E. B. et LOCHHEAD A., 1957. The presence of uridine pyrophosphogalactose and uridine pyrophosphogalactose-4-epimerase in non-galactose adapted yeasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 521-528.
- MONOD J., 1942. « *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes* ». Hermann ed., Paris.
- MONOD J., COHEM-BAZIRE G., et COHN M., 1951. Sur la biosynthèse de la β -galactosidase (lactase), chez *Escherichia coli*. La spécificité de l'induction. *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 585-599.
- MONOD J. et COHN M., 1952. La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique). *Adv. Enzymol.*, **13**, 67-116.
- MONOD J., PAPPENHEIMER A. M. jr. et COHEN-BAZIRE G., 1952. La cinétique de la biosynthèse de la β -galactosidase chez *Escherichia coli* considérée comme fonction de la croissance. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 648-660.
- MONOD J., 1955. Données nouvelles sur la biosynthèse des enzymes. Adaptation enzymatique. *Exp. Ann. Bioch. Med.*, **17**, 195-211.
- MONOD J., 1956. Remarks on the mechanism of enzyme induction, in « *Enzymes, units of biological structure and function* », Acad. Press, New York, p. 7-28.
- MORSE M. L., LEDERBERG E. M. et LEDERBERG J., 1956. Transductional heterozygotes in *Escherichia coli*. *Genetics*, **41**, 758-779.
- MUNCH-PETERSEN A., KALCKAR H. M., CUTOLO E. et SMITH E. E. B., 1953. Uridyltransferases and the formation of uridine triphosphate. *Nature*, **172**, 1036-1037.
- MUNCH-PETERSEN A., 1954. Metabolism of uridine triphosphate in yeast. *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1102-1103.
- MUNCH-PETERSEN A., KALCKAR H. M., et SMITH E. E. B., 1955. Kgl. Danske Videnskab. Selskab, *Biol. Med.*, **7**, 3.
- MUNDKUR B. D. et LINDEGREN C. C., 1949. An Analysis of long-term adaptation to galactose by *Saccharomyces*. *Amer. J. Bot.*, **36**, 722-727.
- NAJJAR V. A., 1948. The isolation and properties of phosphoglucomutase. *J. Biol. Chem.*, **175**, 281-290.
- NEIDHARDT F. C. et MAGASANIK B., 1957. Effect of mixtures of substrates on the biosynthesis of inducible enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, **73**, 260-263.
- NELSON N., 1955. Vthesis, Wash. Univ., Seattle.
- NEUFELD E. F., GINSBURG V., PUTMAN E. W., FANSHIER D. et HASSID W. Z., 1957. Formation and interconversion of sugar nucleotides by plant extracts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 602-616.
- NOSSAL P. M., 1953. A mechanical cell desintegrator. *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sc.*, **31**, 583-590.
- OGSTON A. G., 1948. Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature*, **162**, 963.
- PARDEE A. B., JACOB F. et MONOD J., 1958. Sur l'expression et le rôle des allèles inductibles et constitutif dans la synthèse de la β -galactosidase chez des zygotes d'*Escherichia coli*. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, 3125-3126.
- PARDEE A. B., 1959. Mechanisms for control of enzyme synthesis and enzyme activity in bacteria, in « *Regulations of cell metabolism* », Ciba Found. Symp., p. 295-310.
- PARDEE A. B., JACOB F. et MONOD J., 1959. The genetic control and cytoplasmic expression of « inducibility » in the synthesis of β -galactosidase by *E. coli*. *J. Molec. Biol.*, **1**, 165-178.
- PASTEUR L., 1856. Note sur le sucre de lait. Lettre de M. Pasteur à M. Biot. *C. R. Acad. Sc.*, **42**, 34-35.
- PARTRIDGE S. M., 1948. Filter-paper partition chromatography of sugars. I-General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. *Biochem. J.*, **42**, 238-250.
- PARTRIDGE S. M., 1949. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugar. *Nature*, **164**, 443.
- PETERSON E. A. et SOBER H. A., 1956. Chromatography of proteins I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 751-755.
- PIGMAN W. W. et GOEPP R. M., 1948. « *Chemistry of the carbohydrates* », Acad. Press, New York.
- POLLOCK M. R. et PERRET C. J., 1951. The relation between fixation of penicillin sulphur and penicillinase adaptation in *Bacillus cereus*. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **32**, 387.
- POLLOCK M. R., 1953. Stages in enzyme adaptation, in « *Adaptation in microorganisms* », Cambridge Univ. Press., p. 150-183.
- POLLOCK M. R., 1956. An immunological study of the constitutive and the penicillin-induced penicilli-

- nases of *Bacillus cereus*, based on specific coenzymes neutralization by antibody. *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 90-108.
- POLLOCK M. R., 1959. Induced formation of enzymes, in « *The enzymes* », 2nd Ed., Acad Press, New York, p. 619-680.
- PULLMAN M. E., SAN PIETRO A. et COLOWICK S. P., 1954. On the structure of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **206**, 129-141.
- PULLMAN A. et PULLMAN B., 1959. Recherches sur la structure électronique des constituants cellulaires fondamentaux et des composés actifs en chimiothérapie anticancéreuse. VI. Les pyrimidines naturelles fondamentales. *Bull. Soc. Chim. France*, p. 594-597.
- PUTMAN E. W. et HASSID W. Z., 1957. Anomeric 1-dicyclohexylammonium phosphate esters of D-glucopyranose, D-galactopyranose, D-xylopyranose et L-arabinopyranose. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5057-5060.
- RACKER E. et KRIMSKY I., 1952. The mechanism of oxidation of aldehydes by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **198**, 731-743.
- RACKER E. et KRIMSKY I., 1958. Approaches to the mechanism of action of double-headed enzymes. *Fed. Proc.*, **17**, 1135-1141.
- REINER J. M. et SPIEGELMAN S., 1947. The preadaptive oxidation of galactose by yeast. *J. Gen. Physiol.*, **31**, 51-74.
- RENAMUS R., FAUCONNEAU G. et GUNTZ G., 1958. Isolement d'un nouveau nucléotide dans le lait de brebis : le guanosine-5-diphosphate fucose. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, 2820-2823.
- RICKENBERG H. V. et LESTER G., 1955. The preferential synthesis of β -galactosidase in *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **13**, 279-284.
- RICKENBERG H. V., COHEN G. N., BUTTIN G. et MONOD J., 1956. La galactoside-perméase d'*Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 829-857.
- ROBICHON-SZULMAJSTER H., de, 1958. Induction of enzymes of the galactose pathway in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **127**, 28-29.
- ROBICHON-SZULMAJSTER H., de 1958a. Uridine-diphosphogalactose-4-epimerase, an adaptive enzyme in *Saccharomyces fragilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 270-272.
- ROBICHON-SZULMAJSTER H. de et SOMLO M., 1959. Contrôle exercé par le tryptophane sur la biosynthèse de deux systèmes inductibles chez la levure. *C. R. Acad. Sc.*, **249**, 1583-1585.
- ROMAN H. L., HAWTHORNE D. C. et DOUGLAS H. C., 1951. Polyploidy in yeast and its bearing on the occurrence or irregular genetic ratios. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **37**, 79-84.
- SCHMID R., HAMMACKER L. et AXELROD J., 1957. The enzymatic formation of bilirubin glucuronide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 285-288.
- SELS A. A., 1958a. Recherches sur le mécanisme de l'induction des hémoprotéines pendant l'aération chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.*, **66**, 127.
- SELS A. A., 1958b. Recherches sur la nature de l'initiateur d'une chaîne d'induction hémoprotéique pendant l'aération chez *Saccharomyces cerevisiae* : mutant « petite colonie ». *C. R. Soc. Biol.*, **152**, 1204-1205.
- SLONIMSKI P. P., 1953. « *Recherches sur la formation des enzymes respiratoires* ». Desoer ed., Liège.
- SLONIMSKI P. P., 1956. Adaptation respiratoire : Développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. *Proc. 3rd Int. Congr. Biochem.*, Acad. Press, New York, p. 242-252.
- SLONIMSKI P. P. et de ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1957. Specific polyhydroxycompounds as cofactors of enzymic adaptation and its inheritance, in « *Drug resistance in microorganisms* », Ciba Found. Symp., p. 210-230.
- SLONIMSKI P. P. et TYSAROWSKI W., 1958. Sur l'existence de deux deshydrogénases lactiques chez la levure et sur la conversion, au sein de la cellule, de l'une en l'autre. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, 1111-1114.
- SMITH E. E. B. et MILLS G. T., 1954. Uridine nucleotide compounds of liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 386-400.
- SOBER E. A., GUTTER F. J., WYCKOFF M. M. et PETERSON E. A., 1956. Chromatography of proteins. II. Fractionation of serums protein on anion-exchange cellulose. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 756-763.
- SOHNEN N. L. et COOLHAAS C., 1924. The fermentation of galactose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **9**, 131-144.
- SOLS A. et CRANE R. K., 1954. Substrate specificity of brain hexokinase. *J. Biol. Chem.*, **210**, 581-595.
- SOLS A., de la FUENTE F. et ALVARADO., 1958. Active transport of hexoses in yeasts. *Abstr. 4th Intern. Congr. Biochem.*, p. 78.
- SPIEGELMAN S., LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1945. Maintenance and increase of a genetic character by a substrate cytoplasmic interaction in the absence of the specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **31**, 95-102.
- SPIEGELMAN S., REINER J. M. et MORGAN I., 1947a. The apoenzymatic nature of adaptation to galactose fermentation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **12**, 113-125.
- SPIEGELMAN S., REINER J. M., et COHNBERG R., 1947b. The relation of enzymatic adaptation to the metabolism of endogenous and exogenous substrates. *J. Gen. Physiol.*, **31**, 27-49.
- SPIEGELMAN S., SUSSMAN R. R. et PINSKA E., 1950. On the cytoplasmic nature of « long-term adaptation » in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **36**, 591-606.
- SPIEGELMAN S., 1951. The particulate transmission of enzyme-forming capacity in yeast. *Cold Spring Harbor Symp.*, **16**, 87-98.
- SPIEGELMAN S., de LORENZO W. F., et CAMPBELL M., 1951. A single cell analysis of the transmission of enzyme-forming capacity in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **37**, 513-524.
- SPIEGELMAN S., et de LORENZO W. F., 1952. Substrate stabilization of enzyme forming capacity during the segregation of a heterozygote. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **38**, 583-592.
- SPIEGELMAN S. et HALVORSON H. O., 1953. The nature of the precursor in the induced synthesis of enzymes, in « *Adaptation in microorganisms* », Davies R. et Gale E. F. ed., Cambridge Univ. Press., p. 98-131.
- SPIEGELMAN S., 1955. The present status of the induced synthesis of enzymes. *Abstr. 3rd Intern. Cong. Biochem.*, p. 220.

- SPIEGELMAN S., HALVORSON H. O. et BEN-ISHAI R., 1955. Free amino acids and the enzyme forming mechanism, in «*Amino acid metabolism*», Mc ELROY W. D. et GLASS B. ed., Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 124-170.
- SPIEGELMAN S., 1956. On the nature of the enzyme-forming system, in «*Enzymes, units of biological structure and function*», Acad. Press, New-York, p. 67-89.
- STANIER R. Y., 1947. Simultaneous adaptation : a new technique for the study of metabolic pathways *J. Bacteriol.*, **54**, 339.
- STEPHENSON M. et YUDKIN J., 1936. Galactozymase considered as an adaptive enzyme. *Biochem. J.*, **30**, 506-514.
- STIER T. J. S., SCALF R. E. et BROCKMAN M. C., 1950. An all-glass apparatus for the continuous cultivation of yeast under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, **59**, 45-49.
- STOREY L. D. E. et DUTTON G. J., 1955. Uridine compounds in glucuronic acid metabolism-2. The isolation and structure of «*uridine-diphosphate-glucuronic acid*». *Biochem. J.*, **59**, 279-288.
- STROMINGER J. L., MAXWELL E. S., AXELROD J. et KALCKAR H. M., 1957. Enzymatic formation of uridine diphosphoglucuronic acid. *J. Biol. Chem.*, **224**, 79-90.
- STROMINGER, J. L., 1960. Monocleotide acid anhydrides and related compounds as intermediates in metabolic reactions. *Physiol. Rev.*, **40**, 55-111.
- SZENT-GYORGYI A., 1957. «*Bioenergetics*», Acad Press, New York.
- TANRET C., 1902. Sur l'extraction des sucres réducteurs (monoses). *Bull. Soc. Chim. France*, **27**, (3^{ème} série) 392-398.
- TAYLOR E. S., 1947. The assimilation of amino-acids by bacteria-3. Concentration of free aminoacids in the internal environment of various bacteria and yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 86.
- TREVELYAN W. E., 1958. Synthesis and degradation of cellular carbohydrates by yeasts, in «*The chemistry and biology of yeasts*», COOK A. H. ed., Acad. Press, New York, p. 369-436.
- TRUCCO R. E., CAPUTTO R., LOLOIR L. F. et MITTELMAN N., 1948. Galactokinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **18**, 137-146.
- UMBREIT W. W., BURRIS R. H. et STAUFFER J. F., 1949. «*Manometric techniques and tissues metabolism*», Burgess Pub. Co, Minneapolis.
- VELICK S. F., 1953. Coenzyme binding and the thiol groups of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **203**, 563-573.
- VENNESLAND B. et WESTHEIMER F. H., 1954. Hydrogen transport and steric specificity in reactions catalyzed by pyridine nucleotide dehydrogenases, in «*Mechanisms of enzyme action*», John Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 357-388.
- VENNESLAND B., 1958. Stereospecificity of hydrogen transfer in pyridine nucleotide dehydrogenase reaction. *Fed. Proc.*, **17**, 1150-1157.
- VOGEL H. J., 1957. Repression and induction as control mechanisms of enzyme biogenesis. The «*adaptive*» formation of acetylornithinase, in «*The chemical basis of heredity*», Johns Hopkins Univ. Press, p. 276-296.
- WAJZER J., 1949. Test spectrophotométrique de l'hexokinase. *C. R. Acad. Sc.*, **229**, 1270-1272.
- WARAVDEKAR V. S. et SASLAW L. D., 1957. A method of estimation of 2-deoxyribose. *Biochim. Biophys. Acta.*, **24**, 439.
- WESTHEIMER F. H., FISHER H. F., CONN E. E. et VENNESLAND B., 1951. The enzymatic transfer of hydrogen from alcohol to DPN. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 2403.
- WESTHEIMER F. H., 1954. «*One electron*» and «*two-electrons*» oxidation-reduction reactions in inorganic and organic chemistry, in «*Mechanism of enzyme action*», Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore p. 321-356.
- WHITE J., 1954. «*Yeast technology*». CHAPMAN and HALL ed., London.
- WICK A. N., DRURY D. R., NAKADA H. I. et WOLFE J. B., 1957. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J. Biol. Chem.*, **224**, 963-969.
- WILLSTATTER R. et ROHDEWALD M., 1937. Über die erste Phase der Gärung durch Hefe. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **247**, 269-280.
- WINER A. D., SCHWERT G. W. et MILLAR D. B. S., 1959. Fluorometric measurements of the complex of enzyme and reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1149-1155.
- WINGE O. et LAUSTEN O., 1937. On two types of spore germination, and on genetic segregation in *Saccharomyces*, demonstrated through single-spore cultures. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.*, **22**, 99-116.
- WINGE O. et LAUSTEN O., 1938. Artificial species hybridization in yeast. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.*, **22**, 235-244.
- WINGE O. et LAUSTEN O., 1939. On 14 new yeast types, produced by hybridization. *C. R. Lab. Carlsberg, sér. physiol.*, **22**, 337.
- WINGE O. et ROBERTS C., 1948. Inheritance of enzymatic characters in yeasts and the phenomenon of long-term adaptation. *C. R. Lab. Carlsberg, sér. physiol.*, **24**, 263-315.
- WINGE O. et ROBERTS C., 1958. Yeast genetics, in «*The chemistry and biology of yeasts*», COOK A. H. ed., Acad. Press, New York, p. 123-156.
- WINZLER R. J., 1940. The oxidation and assimilation of acetate by baker's yeast. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **15**, 343-354.
- WOLIN M. J., SIMPSON F. J. et WOOD W. A., 1958. Degradation of L-arabinose by *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.*, **232**, 559-575.
- WOOD H. G., SCHAMBYE P. et PELTERS G. J., 1957. Lactose synthesis. II. The distribution of ¹⁴C in lactose of milk from the perfused isolated cow udder. *J. Biol. Chem.*, **226**, 1023-1034.
- WOODWARD G. E. et HUDSON M. T., 1954. The effect of 2-deoxy-D-glucose on glycolysis and respiration of tumors and normal tissues. *Cancer Res.*, **14**, 599-605.
- YUDKIN J., 1938. Enzyme variation in microorganisms. *Biol. Rev.*, **13**, 93.
- ZINDER N. D. et LEDERBERG J., 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, **64**, 679-699.

LA FORCE BOULANGÈRE DES BLÉS ET SON APPRÉCIATION AU COURS DE LA SÉLECTION

J. LECLERCQ

avec la collaboration technique de S. BLANCHON

Station de Sélection des Ets Tourneur Frères, Coulommiers (Seine et Marne).

SOMMAIRE

La notion de force boulangère est une notion assez confuse ; on s'accorde pourtant à entendre par là, le plus souvent, qualité plastique de la pâte.

Pour la déterminer, on utilise deux types d'appareils :

- appareils utilisant un système enregistrant l'énergie consommée pendant le pétrissage,
- appareils mesurant la pression ou la traction nécessaire pour rompre une éprouvette de pâte obtenue dans des conditions déterminées.

En comparant les données des deux appareils, on a relevé une correspondance étroite entre divers éléments des diagrammes ; on a apprécié cette liaison en calculant les coefficients de corrélation par la méthode des moindres carrés.

La reproductibilité des résultats est meilleure avec les appareils du premier type, qui paraissent moins exposés aux variations accidentelles.

On a pu mettre en évidence les corrélations qui existent entre les qualités plastiques des pâtes, et les caractéristiques physiques du grain de blé : les qualités plastiques paraissent liées à la dureté du grain de blé, et à l'aptitude de ce dernier à donner des particules grosses lors de la mouture ; la dureté du grain, et la granulation du produit obtenu par concassage de ce grain, apparaissent en effet comme des caractéristiques essentiellement variétales. Le taux de matières azotées est moins nettement variétal.

La capacité d'absorption d'eau paraît être une propriété variétale très importante, liée à la fois aux qualités plastiques et à la dureté du grain de blé.

Pour compléter la méthode de Pelshenke, jugée insuffisante dans les valeurs moyennes, il a paru intéressant de faire une mouture entière, puis d'en faire une pâte avec une quantité d'eau déterminée, en mesurant l'énergie consommée pour la confection de cette pâte. Les résultats ont été en rapport avec le chiffre W, ce qui permet d'utiliser la méthode pour le tri des lignées hybrides dont on ne possède que peu de grains.

I. — INTRODUCTION

La notion de qualité technologique d'un blé est assez confuse, et varie considérablement selon qu'on s'adresse au meunier, au boulanger, ou au consommateur. Nous nous bornerons ici à parler de ce que l'on appelle la « Force boulangère », notion qui n'est d'ailleurs guère plus précise. SAUNDERS (6) écrivait déjà en 1911 :

« En anglais, l'expression « baking strength » n'a aucune signification précise, et je ne crois pas qu'il en soit autrement en français. Parfois, elle se rapporte principa-

lement à l'aptitude que possède la farine d'absorber et de retenir l'eau pendant la panification, parfois à la grosseur et à l'aspect des pains... »

En tous cas, l'appréciation de cette force boulangère nécessite un essai de panification, avec toutes les difficultés que cela comporte, et peu de chercheurs sont équipés à cet effet ; c'est pourquoi l'on a cherché de bonne heure des méthodes simples et rapides, susceptibles de donner des renseignements liés à ceux qu'on pourrait tirer de la panification elle-même. On s'est tout d'abord occupé de la quantité, puis de la qualité du gluten ; de nombreux appareils ont été imaginés dans ce but, depuis les extracteurs automatiques de gluten (Théby), jusqu'au Glutographe de BRABENDER, sans oublier la méthode de PELSHEKE, qui a rendu tant de services.

Par la suite, il a paru souhaitable de déterminer directement les qualités plastiques des pâtes, tenant ainsi compte de tous les constituants de celles-ci. Là encore, on a proposé — et l'on propose encore — de nombreux appareils tendant à éliminer le coefficient personnel des opérateurs. Les appareils, malgré leur conception différente, peuvent se ramener à deux types, qu'on peut définir ainsi :

A. Appareils mesurant la force nécessaire (pression ou traction) pour amener la rupture d'une masse de pâte de forme définie, constituée selon des méthodes précises. Le type en est l'Alvéographe de CHOPIN, où l'on mesure la pression d'air nécessaire pour rompre une mince membrane de pâte. Dans cette catégorie entre aussi l'Extensographe de BRABENDER ; la balance qualitative de TAUPIN fonctionne selon le même principe.

B. Appareils mesurant l'énergie consommée pendant le pétrissage : il s'agit des « dough mixers » très employés aux États-Unis et au Canada, et du Farinographe de BRABENDER répandu en de nombreux pays, et notamment en Amérique Latine.

Les appareils du premier type donnent, en quelque sorte, une mesure instantanée des qualités plastiques de la pâte, tandis que ceux du second type enregistrent l'évolution de ces qualités au cours du pétrissage.

Il nous a paru intéressant de déterminer avec précision la nature et l'intensité des liaisons qui unissent les résultats donnés par chacun des deux appareils. Et en même temps, il était possible de les comparer aux caractéristiques physiques des grains dont la farine avait été utilisée. Puis, utilisant les relations établies entre les unes et les autres, on pouvait tenter de les exploiter en vue d'apprécier rapidement la force boulangère des blés.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

A. — CONDITIONS DE L'ESSAI ET MATIÈRE PREMIÈRE

Les essais ont été réalisés à l'aide de variétés génétiquement pures, provenant de parcelles destinées à des essais comparatifs de rendement : c'est dire que tous les travaux dont il sera question, ont été réalisés sur des blés provenant d'un même lieu, soumis à un même climat, et cultivés en micro-parcelles sur une surface totale ne dépassant pas trois hectares. On est donc fondé à considérer l'ensemble comme une expérience *in vitro*, avec tout ce que cela présente d'inconvénients et d'avantages.

Mais d'autre part, une expérimentation menée sur un milieu restreint permet de chiffrer l'importance des écarts dus au milieu et aux causes indéterminées : si bien que l'on peut mettre en évidence telle ou telle caractéristique variétale qu'une expérience plus vaste n'aurait pas permis de sortir de l'ombre.

Il est donc nécessaire de tenir compte, dans ce qui suivra, de ce trait particulier des essais qui sont exposés.

Les parcelles d'essais retenues ont été récoltées à la main, et battues en vue d'éviter tout mélange de variétés. Après pesée, le contenu de chaque sac a été passé au petit tarare de Laboratoire, afin d'éliminer les restants de balles, et les petits grains fortement échaudés. Puis le grain a été soigneusement examiné : poids de mille grains, indices d'échaudage et de vitrosité, présence éventuelle de grains germés et punaisés, etc. Entre la récolte et la mouture, les échantillons avaient été tenus dans une même pièce, et dans des conditions absolument identiques : leur humidité moyenne au moment même des essais était de 12,5 p. 100, avec des écarts extrêmes de $\pm 0,4$ p. 100.

A ce moment, un prélèvement de cent grammes était placé dans un bocal hermétique, afin d'apprécier ultérieurement la dureté de l'échantillon de blé. On a alors déterminé l'humidité, le

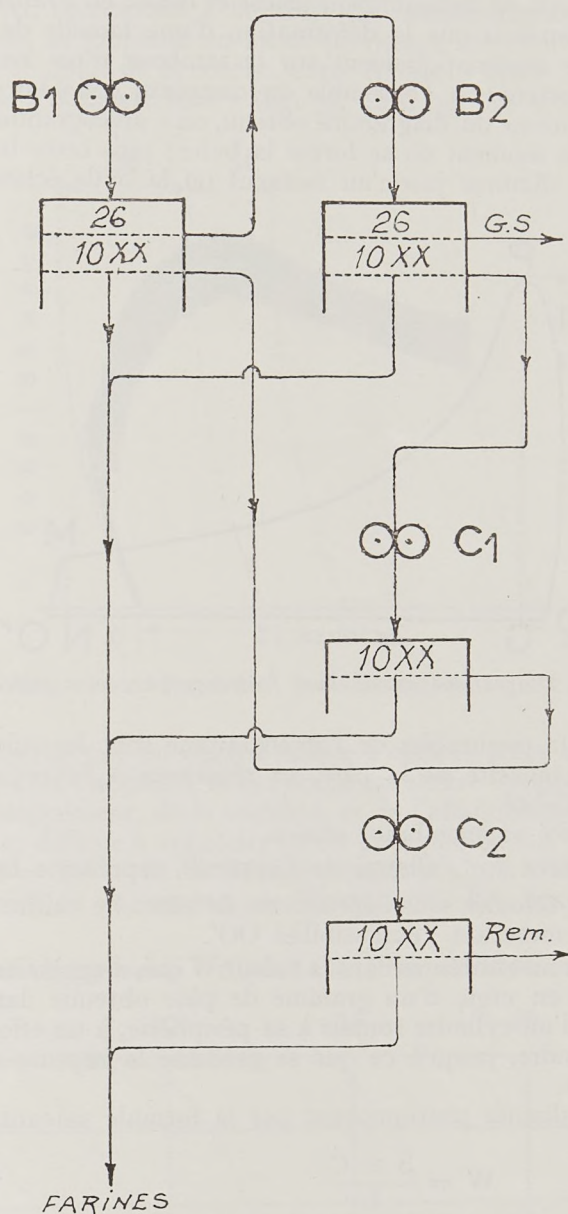


FIG. 1. — Diagramme de mouture utilisé.

blé étant ensuite additionné d'eau en quantité suffisante pour amener l'humidité du grain à 16,5 p. 100 d'eau. On a laissé le grain en récipients hermétiques pendant 24 heures, en agitant fréquemment pour homogénéiser ; puis on a procédé à la mouture au moulin d'essais.

Ce moulin d'essais est un moulin Brabender à deux paires de meules en pierre, l'une servant de broyeur, et l'autre de convertisseur. Mais nous utilisons ce moulin d'une façon différente de celle préconisée par le constructeur : en effet, pour éviter une attaque trop violente du grain, on soulage les meules du broyeur, de façon à écraser grossièrement le blé, en obtenant seulement un peu de farines de broyage ; puis, serrant le broyeur, on fait un deuxième passage ; enfin, les fins sons sont renvoyés au convertisseur. Le taux d'extraction reste voisin de 60 p. 100, et le réglage du convertisseur varie très légèrement selon la variété de blé, pour tenir le taux d'extraction à la valeur voulue : la figure 1 représente le diagramme de broyage pratiquement suivi.

Après la mouture, les farines sont examinées, notées quant à leur couleur et à leur aspect, puis maintenues en bocaux hermétiques à la température du Laboratoire, pendant huit jours au terme desquels a lieu l'essai proprement dit.

B. — LES APPAREILS ET LEURS DONNÉES

Au cours des essais, on a utilisé l'Alvéographe de CHOPIN, le Farinographe de BRABENDER, et le « Doseur de dureté » de BRABENDER. Le dosage de l'azote total a été fait par la méthode de KJELDAHL.

L'alvéographe de CHOPIN est suffisamment utilisé et connu en France, pour qu'il soit nécessaire d'y insister. Rappelons toutefois que la déformation d'une lamelle de pâte, provoquée par une pression d'air, est inscrite automatiquement sur le tambour d'un manomètre enregistreur. Les éléments d'appréciation portent sur l'ensemble du complexe colloïdal que constitue la pâte.

La figure 2 indique la forme du diagramme obtenu, ou « alvéogramme ». La pression augmente brusquement de O à P, au moment où se forme la bulle ; puis cette bulle continue à augmenter de volume, et la pression diminue jusqu'au moment où la bulle éclate.

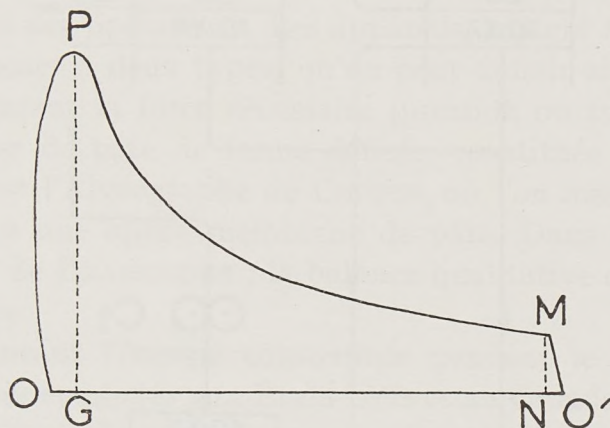


FIG. 2. — Diagramme obtenu avec l'Alvéographe, ou « Alvéogramme ».

Les différents éléments mesurables de l'alvéogramme sont les suivants :

GP = P, mesure la ténacité de la pâte, sa résistance à l'extension.

OO', mesure l'extensibilité.

MN, mesure la ténacité en membrane mince.

G, chiffre lu directement sur l'allonge de l'appareil, représente la racine carrée du nombre de centimètres cubes d'air refoulés sous l'éprouvette de pâte. Le chiffre $G = \sqrt{V}$, est évidemment proportionnel au nombre mesurant l'extensibilité OO'.

Tous ces éléments se trouvent réunis dans la valeur W qui, d'après CHOPIN, représente « le travail de déformation, exprimé en ergs, d'un gramme de pâte obtenue dans certaines conditions, se présentant sous la forme d'un cylindre soumis à sa périphérie, à un effort d'extension obtenu normalement à l'axe du cylindre, jusqu'à ce que se produise la rupture de la membrane circulaire issue de cette extension ».

La valeur de W est donnée pratiquement par la formule suivante :

$$W = \frac{S \times C}{L}$$

avec :

S = surface de l'alvéogramme,

$$C = \frac{V \times 9,81}{7,5 \times 1,09} = 1,20 V.$$

$$V = G^2$$

L = longueur OO' du diagramme.

Le Farinographe de BRABENDER est constitué par un petit pétrin à deux fraseurs tournant en sens inverse et à des vitesses différentes. Ces deux fraseurs sont actionnés par un moteur dynamométrique donnant à tout moment le couple résistant opposé par la pâte, en plus des résistances mécaniques constantes. Le moteur étant mis en marche, les fraseurs compriment et étirent alternativement la pâte, en passant par un point mort. On pétrit 50 g de farine avec une quantité d'eau suffisante pour obtenir en fin de liaison une consistance standard conventionnelle de 500 unités

BRABENDER. Le couple résistant est nul, puis augmente rapidement tandis que s'effectue la liaison des particules de farine, atteint la consistance standard, et ensuite décroît plus ou moins rapidement. Un dosage préalable est donc nécessaire pour déterminer la quantité d'eau nécessaire à l'obtention de la consistance désirée.

Les données fournies par cet appareil sont les suivantes :

- a) Le *pouvoir d'absorption d'eau*, ou quantité d'eau ajoutée à 50 g de farine pour obtenir une pâte de consistance standard : on le détermine par le dosage préliminaire.
- b) Le *développement* Dé, est le temps que la farine met à absorber l'eau pour que la liaison des particules de farine soit complète.
- c) La *stabilité* St, est le temps pendant lequel la pâte résiste sans faiblir au pétrissage.
- d) L'*affaiblissement* Af, correspond à la phase de ramollissement de la pâte.
- e) L'*élasticité de la pâte*, sa souplesse en fin de pétrissage, est exprimée d'après le constructeur de l'appareil, par l'épaisseur finale de la courbe. Cette épaisseur finale El figure sur la reproduction du diagramme obtenu ou « farinogramme » (fig. 3), ainsi que les valeurs Dé, St et Af.

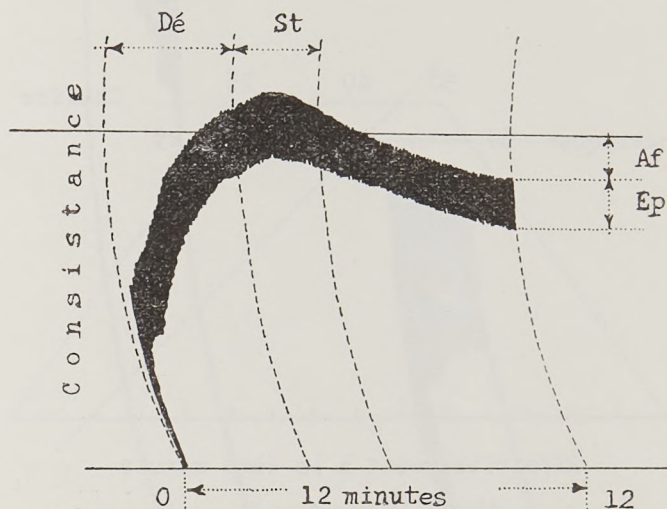


FIG. 3. — Diagramme obtenu avec le Farinographe, ou « Farinogramme ».

L'évaluation de la courbe par un chiffre unique s'obtient grâce au « Valorimètre », sorte de table logarithmique livrée avec l'appareil, et qui donne un chiffre V, appelé « chiffre valorimétrique », fonction à la fois du développement, de la stabilité, et de l'affaiblissement. Dans de très nombreux cas, la stabilité est faible et difficile à apprécier : c'est pourquoi on fait souvent état de la résistance Ré, qui est la somme $Ré = Dé + St$ du développement et de la stabilité.

La figure 4 schématise ce valorimètre de BRABENDER. Les lignes pointillées sont les lieux

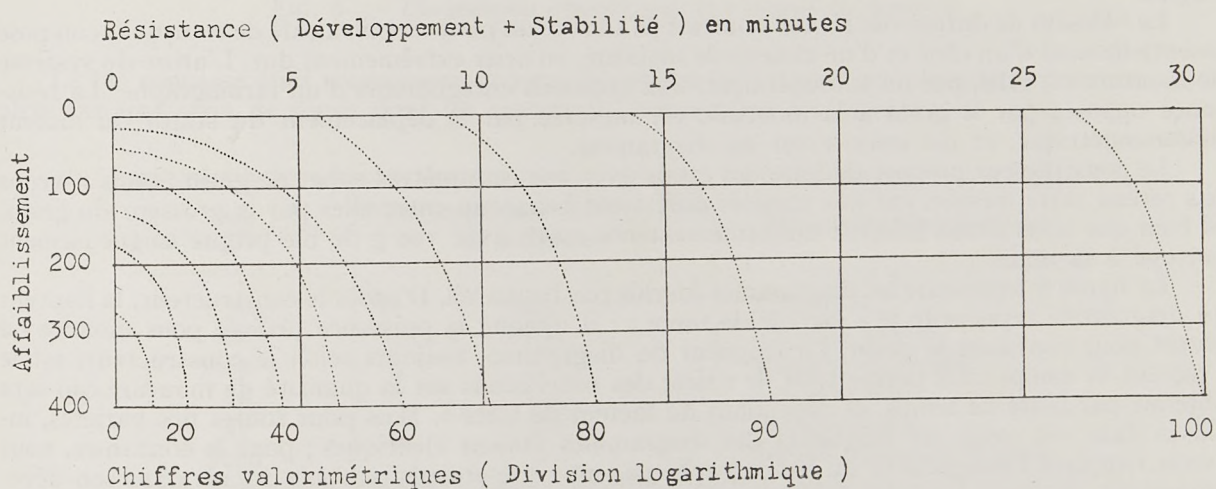


FIG. 4. — Schéma du « Valorimètre » de Brabender.

des blés de même force ; la valeur 0 correspond au blé le plus faible qu'on ait pu trouver, et le chiffre 100 au plus fort. On conçoit évidemment tout ce qu'un tel système a d'arbitraire, puisque tout y est conventionnel.

A l'expérience, nous avons reconnu la nécessité de modifier très légèrement le chiffre valorimétrique obtenu selon la méthode de BRABENDER, en considérant la valeur de l'affaiblissement à la quatrième minute de pétrissage, excepté toutefois pour les blés dont l'affaiblissement est nul ou supérieur à 150 unités de consistance. En comparant les chiffres valorimétriques obtenus pour un blé, avec les alvéogrammes correspondants, et pour plusieurs années, on a établi empiriquement une formule telle que

$$V' = 0,68 V - 0,0533 Af + 16$$

où

V' est la valeur modifiée cherchée,

V le chiffre valorimétrique BRABENDER,

Af l'affaiblissement à la 4^e minute.

L'application de cette formule est simplifiée par une abaque (fig. 5) qui donne directement la valeur V' cherchée.

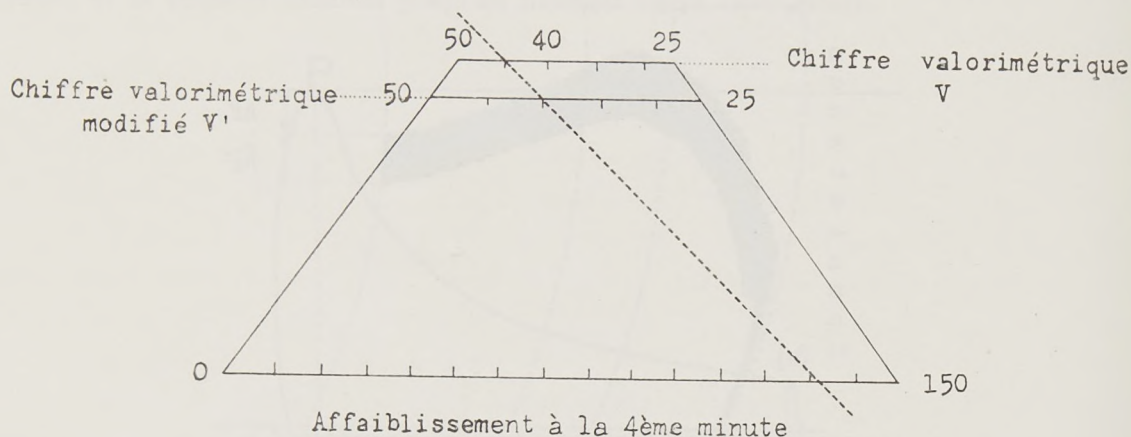


FIG. 5. — Abaque de correction du « valorimètre ».

Sur cette figure, on a figuré en pointillé la lecture de la correction pour un blé dont le chiffre valorimétrique BRABENDER est 45, et qui atteint 133 points d'affaiblissement à la quatrième minute : le chiffre valorimétrique modifié V' est 40. Ainsi, une farine pour laquelle le valorimètre donne une valeur de 40 est notée finalement 43,2 si son affaiblissement est nul à la quatrième minute, ou 35,2 si son affaiblissement atteint 150 dans le même temps : tout revient à accorder une plus-value aux blés dont les courbes s'affaiblissent lentement sans revêtir une forme concave. Dans les essais dont il sera question au cours de cet exposé, c'est toujours de chiffres ainsi modifiés dont il s'agira.

Le « Doseur de dureté » de BRABENDER est en somme un petit moulin à café de comptoir, composé essentiellement d'un cône et d'un anneau de mouture, en acier extrêmement dur. L'arbre du système de mouture est relié, par un accouplement, aux appareils enregistreurs d'un farinographe. La résistance opposée par le grain à la mouture, est mesurée par le déplacement du stator du moteur dynamométrique, et est inscrite sur un diagramme.

Le constructeur propose de faire des essais avec 100 centimètres cubes de grain ; nous n'avons pas retenu cette mesure, car nos variétés différaient beaucoup entre elles par la grosseur du grain. Si bien que nous avons effectué uniformément nos essais avec 100 g de blé propre soigneusement nettoyé à la main.

La figure 6 représente les diagrammes fournis par l'appareil. D'après le constructeur, la hauteur du diagramme représente le « facteur de force » : il indique la puissance utilisée pour moudre ou plutôt pour concasser le grain. La longueur du diagramme, toujours selon le constructeur, est le « facteur de temps » : il permettrait de « tirer des conclusions sur la quantité de mouture qui sera obtenue par unité de temps, et dépendant du facteur de force ». Mais pour toutes nos variétés, incluses dans cet essai, les longueurs des diagrammes étaient identiques ; pour le confirmer, nous avons remplacé l'enregistreur du farinographe par un autre enregistreur très rapide dans son développement, de façon à rendre évidentes les plus petites différences : les longueurs des diagrammes étaient encore absolument identiques.

Les hauteurs des diagrammes, d'ailleurs, étaient beaucoup plus comparables entre elles que ne le laissait prévoir le constructeur. Nos variétés de blé, représentant à peu près toute la gamme des blés français de grande diffusion, étaient beaucoup plus durs que les blés allemands indigènes utilisés par BRABENDER pour étalonner son appareil ; pour obtenir un diagramme intéressant, et même

simplement pour obtenir des ordonnées lisibles, il a fallu utiliser sur le farinographe, un rapport de transmission de 1 à 5, avec un freinage maximum ; en même temps, il a fallu réduire la distance séparant le cône de mouture de l'anneau, car sans cette modification, il était presque impossible de distinguer les variétés entre elles.

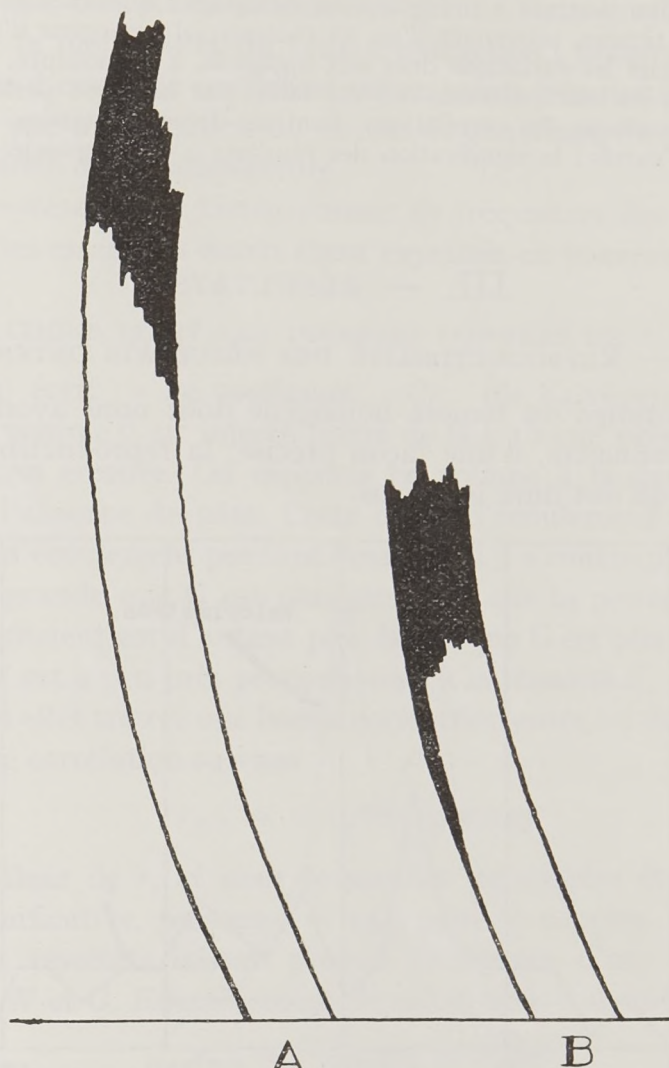


FIG. 6. — Diagrammes obtenus avec le « doseur de dureté ».

Le blé concassé était soigneusement recueilli, et l'on faisait une analyse granulométrique complète sur une série de tamis dont les caractéristiques étaient les suivantes :

N ^o	Ouverture nette en millièmes de millimètre	Désignation des produits
20	1150	Refus gros.
30	690	Semoules grosses.
38	550	Semoules moyennes.
46	450	Semoules fines.
70	230	Farines rondes.
fond	—	Farines moyennes et fines.

Après l'analyse granulométrique, les différents passages étaient mélangés, puis passés au moulin à café PEUGEOT, afin de réduire le tout en une fine mouture ; après quoi, cette boulangue était utilisée pour l'appréciation rapide de la force boulangère sur blé entier concassé, selon la méthode que nous exposerons par la suite au chapitre IV.

C. — LES MÉTHODES D'ÉTUDE

Après mouture et homogénéisation, chaque lot de farine était laissé au repos pendant huit jours, puis utilisé, partie pour les essais à l'alvéographe, partie pour les essais au farinographe. On a appliqué scrupuleusement, pour chaque appareil, les instructions données par les constructeurs ; on a effectué chaque jour des contrôles destinés à prévenir tout dérèglement ; quotidiennement, on a passé aux différents appareils un témoin, provenant d'un lot commercial homogène d'une variété pure (Vilmorin 27) afin d'apprécier les variations dues aux appareils, à la mouture, aux conditions atmosphériques, etc. Toutes les manipulations ont été faites par la même personne.

Pour l'étude systématique des corrélations liant les diverses données, nous avons utilisé la méthode des moindres carrés ; la signification des résultats a été appréciée à l'aide du test *t* de STUDENT-FISHER.

III. — RÉSULTATS

A. — REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS OBTENUS

Le passage quotidien du témoin homogène dont nous avons parlé plus haut, nous a permis de connaître, d'une façon précise, la reproductibilité des appareils, sur les cinq années qu'ont duré les essais.

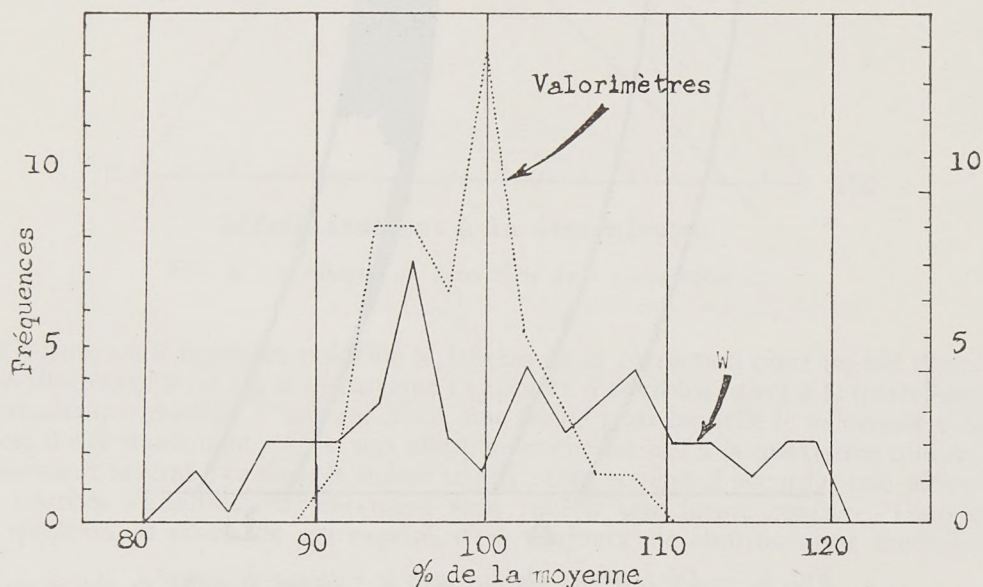


FIG. 7. — Histogrammes des fréquences des W et des V pour une année étudiée (1953)

Le doseur de dureté fournit des données absolument surperposables, mais il n'en est pas de même pour l'alvéographe, ni pour le farinographe. Pour chaque appareil, nous avons calculé le coefficient de variation, qui est le rapport de l'écart — type à la moyenne, exprimé en pourcentage de cette dernière. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Année	Coefficients de variation du	
	W de l'alvéographe	V du farinographe
1 ^{re} année	10,0	4,7
2 ^e année	13,7	3,7
3 ^e année	13,0	4,0
4 ^e année	13,1	1,9
5 ^e année	8,4	3,2

Le coefficient de variation du W apparaît donc égal en moyenne à 11,6 pour les 5 années, et celui du valorimètre à 3,5. Le coefficient de variation du W est environ trois fois plus élevé que le coefficient de variation du valorimètre ; l'alvéographe est plus sensible aux conditions extérieures que le farinographe, et en particulier aux variations de la mouture et du taux d'extraction ; notons toutefois que, pour la cinquième année d'essais, le coefficient est en baisse très nette pour l'alvéographe : ceci correspond à une modification du circuit de chauffage du pétrin tendant à une plus grande régularité de la température.

La figure 7 représente les histogrammes de fréquences des W et des V pour la cinquième année des essais, les écarts étant exprimés en pourcentage de la moyenne.

B. — RELATIONS LIANT LES DIVERSES DONNÉES DE L'ALVÉOGRAPHE

P. NOTTIN (3) écrit : « Le coefficient... (C)... (de l'alvéographe)... est établi en admettant que le volume d'air injecté (carré de G à 10 cm³ près), est égal à celui de la bulle, supposition erronée. On rapporte ce volume à la durée d'écoulement de l'air, mesurée en l'absence de pâte. Cette durée d'écoulement sans contre-pression diffère de la durée d'écoulement pendant l'essai où il y a contre-pression. La différence est d'autant plus grande que G est plus grand et que la perméabilité est moindre. Finalement, le coefficient est d'autant plus faible que G est plus grand, de sorte que pratiquement le W est à peu près proportionnel à la ténacité P... »

Nous avons en effet trouvé une bonne corrélation entre les valeurs W et P, définie par le coefficient de corrélation suivant :

$$r_{w,p} = + 0,887 \pm 0,025$$

Pour cette valeur de r , et pour le nombre de couples étudiés, la corrélation est hautement significative, puisque $t = 15,9$ pour 70 couples.

L'examen des résultats laissait prévoir l'existence d'une corrélation inverse, mais faible, entre W et G. Effectivement, le calcul nous a donné :

$$r_{w,g} = - 0,303 \pm 0,108$$

avec $t = 2,6$ pour les mêmes 70 couples de mesures ; la corrélation est significative au seuil de 0,05.

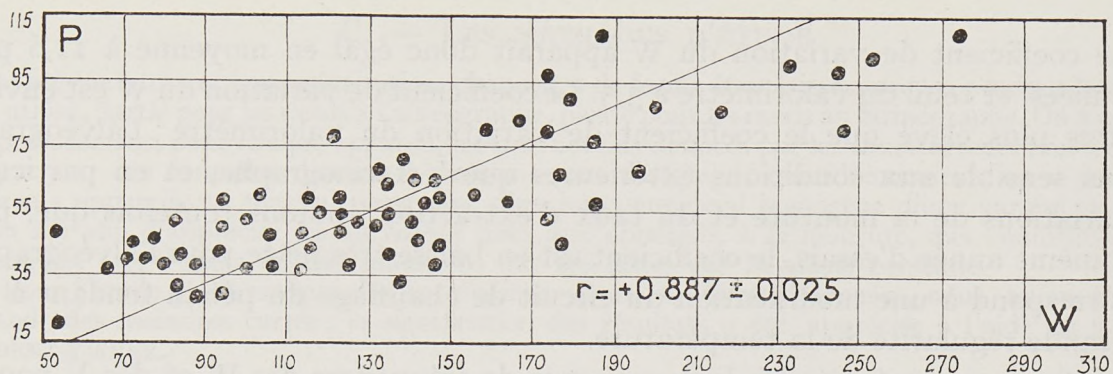
Nous avons calculé les coefficient $r_{w,g}$ sur toutes les années où les essais se sont poursuivis : la valeur $- 0,303$ paraît être un maximum ; le plus souvent, la corrélation est faible ou nulle ; mais si elle est faible, elle est toujours à tendance négative. A vrai dire, cette corrélation peut être observée fréquemment ; ainsi, lors de la récolte 1951, la diminution moyenne du W par rapport à celui de l'année précédente s'accompagne d'une augmentation de G (sauf dans la région parisienne et à Castelnaudary) (4). A la récolte de 1953, le W diminue généralement par rapport aux années précédentes, sauf dans le Midi où il augmente, tandis que le G augmente partout, sauf précisément dans le Midi où il diminue (4). La même année, où l'on note en Normandie une faible diminution de la force boulangère, les G restent semblables à ceux de l'année précédente (5).

Il existe évidemment entre P et G, une corrélation inverse que nous avons calculée :

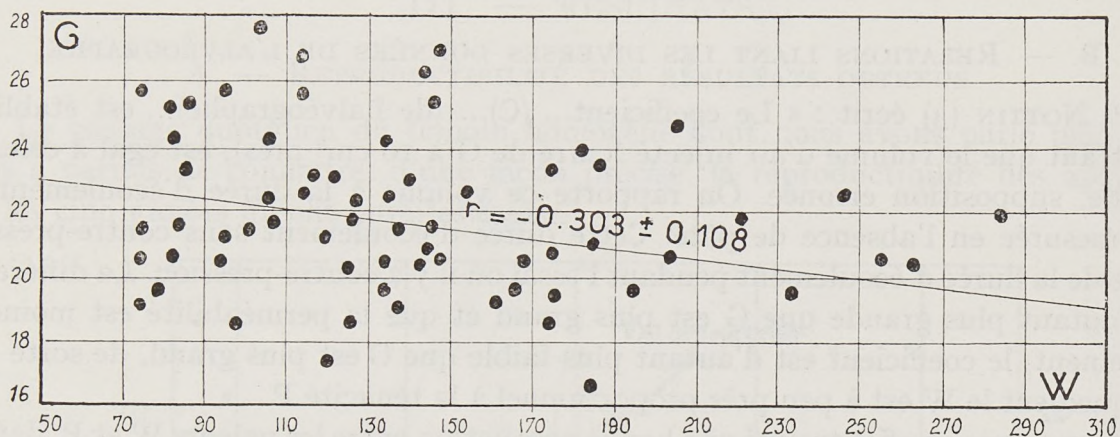
$$r_{p,g} = - 0,622 \pm 0,073$$

La corrélation est significative avec $t = 6,55$.

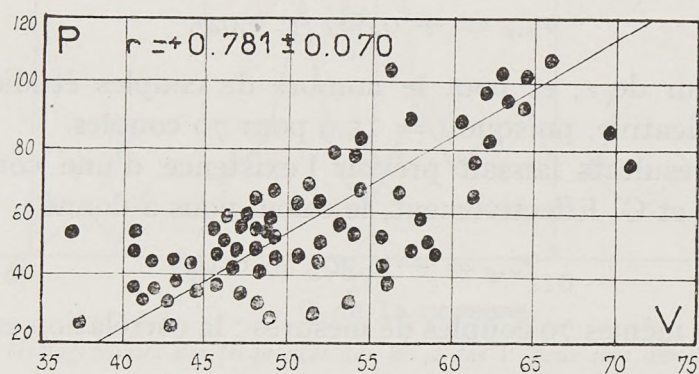
W / P



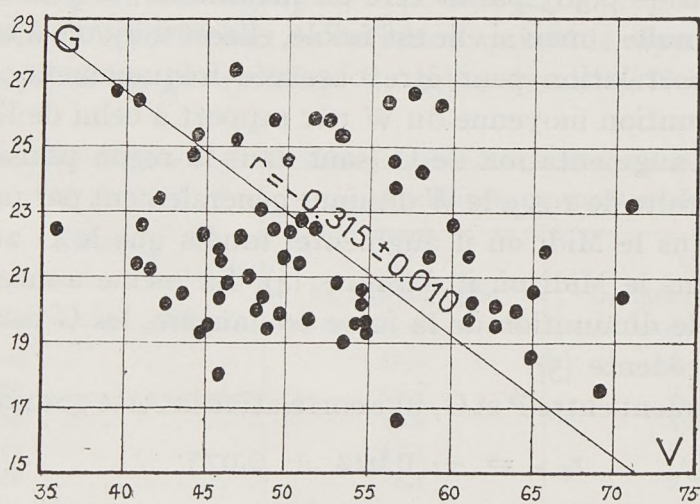
W / G



VALORIMÈTRE / P



VALORIMÈTRE / G



Il est possible de connaître les coefficients de corrélation partiels, déterminés à l'aide de la formule usuelle

$$r_{wp,g} = \frac{r_{wp} - (r_{wg} \cdot r_{pg})}{\sqrt{(1 - r_{wg}^2)} \sqrt{(1 - r_{pg}^2)}}$$

les valeurs $r_{pg,w}$ et $r_{pg,w}$ étant obtenues par permutation circulaire. Nous avons obtenu les résultats suivants : pour une série d'alvéogrammes où la valeur G est constante, il existe entre les valeurs W et P, une corrélation positive très élevée définie par le coefficient

$$r_{wp,g} = + 0,936$$

Et si c'est P qui est constant, la corrélation entre W et G devient évidemment positive et telle que :

$$r_{wg,p} = + 0,689$$

Enfin, si l'on considère des courbes ayant le même W, il y a corrélation inverse entre les caractéristiques P et G :

$$r_{pg,w} = - 0,804$$

En résumé, le G apparaît comme très peu lié à la valeur W, contrairement à la valeur P ; on sait d'ailleurs que les variations de G sont faibles en comparaison des valeurs de P : on s'en rendra d'ailleurs compte par l'examen des caractéristiques de dispersion des valeurs étudiées :

	Moyenne	Écart-type	Coefficient de variation
W	138,5	58,50	42,2
P	57,8	22,84	39,5
G	21,8	2,50	11,4

Le coefficient de variation est, comme nous l'avons dit plus haut, le rapport de l'écart-type à la moyenne, exprimé en pourcentage de cette dernière.

C. — RELATIONS LIANT LES DONNÉES DE L'ALVÉOGRAPHE A CELLES DU FARINOGRAPHE

1° *Le P de l'alvéographe et le pouvoir d'absorption d'eau :*

Comme nous l'avons indiqué plus haut, le pouvoir d'absorption d'eau peut être mesuré par la quantité d'eau nécessaire pour produire une pâte ayant une consistance standard convenue en fin de liaison. Or, « La ténacité P... est en relation avec l'absorption de la farine, puisqu'une même quantité d'eau totale est employée lors du pétrissage... » (2).

En effet, il existe une assez bonne corrélation entre les nombres qui mesurent les deux grandeurs :

$$r_{p,a} = + 0,553 \pm 0,080$$

avec $t = 5,4$ pour 68 degrés de liberté : la corrélation est donc significative.

2° *Le W de l'alvéographe et le chiffre valorimétrique :*

Il s'agit des chiffres valorimétriques modifiés selon l'allure de la courbe à la quatrième minute de pétrissage, comme nous l'avons indiqué précédemment. Nous ne nous sommes pas limités ici à 5 années comme pour l'étude de la reproductibilité des résultats : nous avons pu utiliser des résultats allant de 1938 à 1955.

Les coefficients de corrélation entre W et V (chiffres valorimétriques modifiés) admettent les extrêmes suivants pour les années étudiées :

$$\text{Maximum : } r_{wv} = + 0,816 \pm 0,042$$

$$\text{Minimum : } r_{wv} = + 0,606 \pm 0,051$$

toutes les corrélations calculées étant significatives.

Il paraît donc bien y avoir une relation entre les deux valeurs. Pour nous en assurer, nous avons calculé un coefficient r' par la méthode des corrélations transformées (1) en utilisant la variable

$$z = \frac{1}{2} \{ (\log_e (1 + r) - \log_e (1 - r)) \}$$

Le coefficient r' est :

$$r'_{wv} = + 0,711 \pm 0,018$$

Nous avons vérifié la signification de ce résultat à l'aide de la valeur χ^2 , calculée à partir des données de chacune des années étudiées :

$$\chi^2 = 15,96$$

ce qui correspond à une probabilité d'environ 0,05 pour le nombre de degrés de liberté correspondants. Les coefficients $r_{pg,w}$ calculés pour chacune des années séparément, ne contredisent donc pas l'existence d'un coefficient unique

$$r' = + 0,711 \pm 0,018$$

applicable à l'ensemble.

Sachant maintenant que les deux appareils donnent des résultats globaux comparables, on peut examiner deux à deux les résultats partiels donnés par les deux sortes de courbes. Or, l'alvéogramme étant essentiellement caractérisé par P et par G, nous avons tout d'abord cherché les relations liant P, G, et les chiffres valorimétriques V.

3° *Les valeurs P, G, et les chiffres valorimétriques V :*

Dans les deux cas (V et P d'une part, V et G de l'autre), il existe une corrélation significative ; et comme il fallait s'y attendre, l'une est directe et l'autre est inverse :

$$r_{vp} = + 0,781 \pm 0,070$$

$$r_{vg} = + 0,315 \pm 0,001$$

Les deux corrélations sont significatives, mais il faut remarquer que les relations entre V et G sont faibles.

Il est intéressant de comparer les corrélations qui unissent W d'une part, et V d'autre part, aux caractéristiques P et G :

	P	G
W	+ 0,887	— 0,303
V	+ 0,781	— 0,314

Il est dès lors permis de penser que — dans le cadre de notre étude tout au moins — les qualités plastiques mesurées par P et par G sont appréciées aussi bien par le farinographe que par l'alvéographe de CHOPIN.

Il importe donc de connaître, aussi exactement que possible, les éléments respectifs du farinographe qui correspondent aux valeurs P et G. C'est pourquoi nous avons entrepris l'établissement systématique des corrélations liant P, G, et les trois données du farinographe :

- Développement Dé
- Stabilité St
- Affaiblissement Af

Par la suite, nous avons été amenés à considérer un autre élément qui n'intervient pas dans le calcul du chiffre V : l'épaisseur finale de la courbe El, qui présente une certaine importance.

4^o La valeur P et les données du farinographe :

Nous avons comparé P aux trois éléments du farinogramme mentionnés ci-dessus ; les quatre données se dispersaient avec les caractéristiques suivantes :

	Moyenne	Variance
Ténacité P	58,5	531,9
Développement Dé	27,0	150,9
Stabilité St	53,2	495,9
Affaiblissement Af	16,4	18,3

Les données du farinographe sont exprimées en millimètres mesurés sur les courbes, et non en unités BRABENDER ou en minutes.

Voici les coefficients de corrélation obtenus :

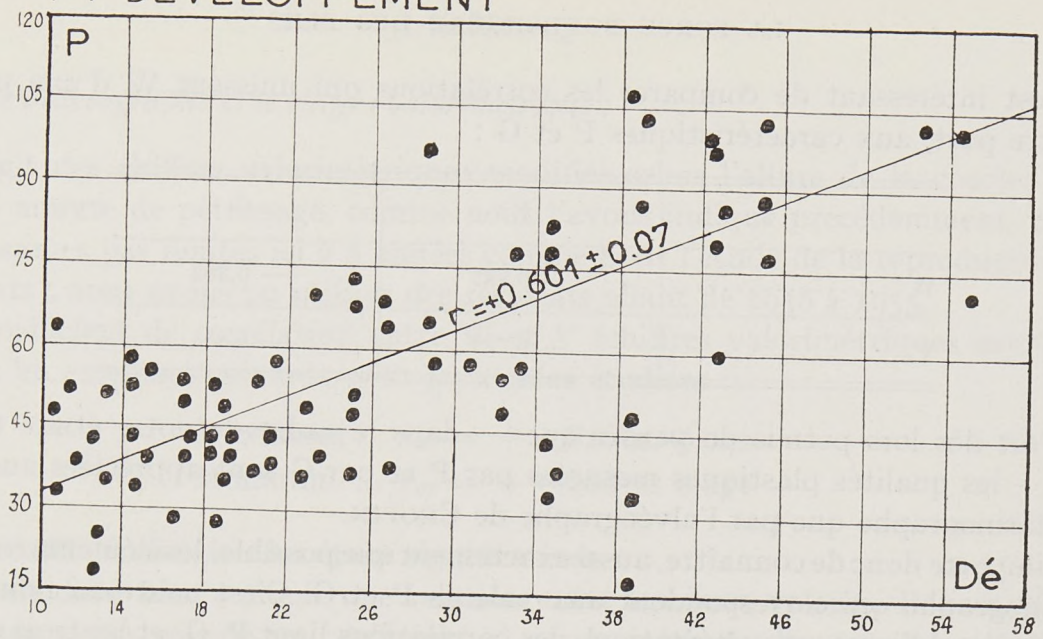
$$r_{p,dé} = + 0,601 \pm 0,07$$

$$r_{p,st} = + 0,756 \pm 0,05$$

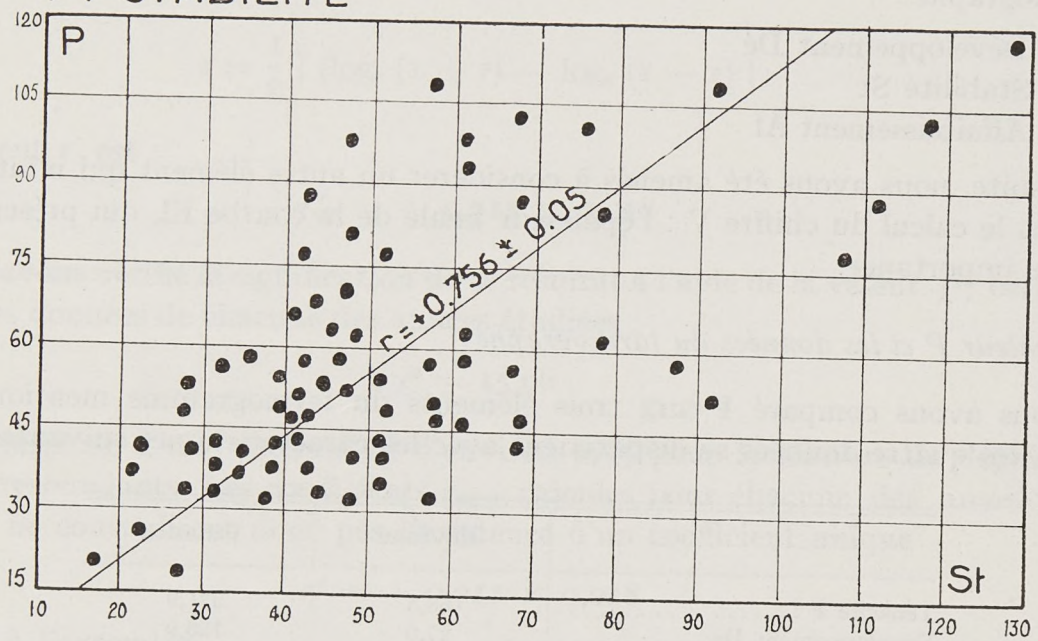
$$r_{p,af} = - 0,697 \pm 0,06$$

Les trois corrélations sont hautement significatives. Nous savions déjà que P était en rapport avec le pouvoir d'absorption d'eau, lequel est en relations avec le développement ; il était logique de penser qu'il serait lié à la forme générale du farinogramme. Il est toutefois intéressant de noter que c'est la stabilité qui représente le mieux la valeur P de l'alvéographe : une farine à P élevé est donc une farine de bonne tenue au pétrissage, avec un affaiblissement réduit ou nul.

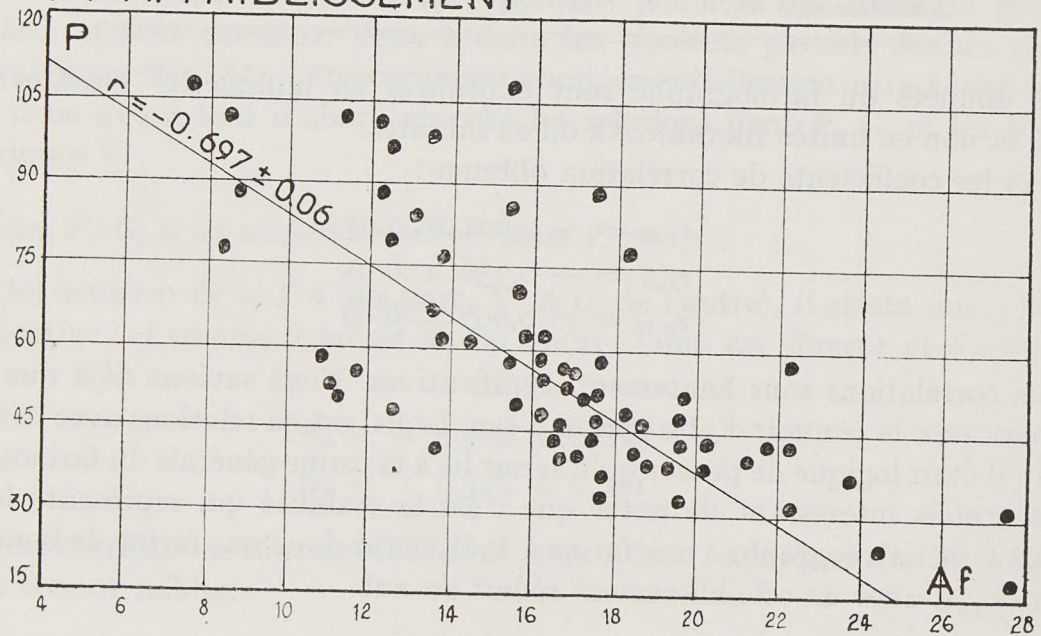
P / DÉVELOPPEMENT



P / STABILITÉ



P / AFFAIBLISSEMENT



5° La valeur G et les données du farinographe :

Nous avons prodédé comme avec la valeur P , en examinant successivement les trois éléments du farinogramme.

Entre le développement et G , nous avons trouvé une corrélation telle que :

$$r_{g,dé} = - 0,310 \pm 0,100$$

Cette corrélation est faible, mais elle est significative, puisque $t = 2,688$ pour 68 degrés de liberté, et que l'on a comme valeur limite $t = 2,648$ pour 70 degrés de liberté et une probabilité de 0,01.

On pouvait supposer que G serait en corrélation positive avec l'affaiblissement Af . Effectivement, nous avons trouvé :

$$r_{g,af} = + 0,251 \pm 0,100$$

C'est là une corrélation très faible ; elle est significative pour une probabilité de 0,05, mais de justesse. Nous avons enfin considéré la liaison entre G et la stabilité, et nous avons trouvé :

$$r_{g,st} = - 0,110$$

corrélation non significative : on peut donc admettre qu'il n'y a pas de rapport entre G et la stabilité.

Pratiquement, on voit que G n'apparaît guère, sauf dans sa liaison avec le développement, avec un coefficient de corrélation comparable à celui qui unit W et G . Nous avons donc recherché, dans les farinogrammes, d'autres éléments susceptibles d'apporter une meilleure approximation de G .

Or, BRABENDER indique que l'épaisseur finale de la courbe farinographique fournit une appréciation de l'élasticité. P. NOTTIN (3), au contraire, affirme que « si l'épaisseur du trait a une signification, ce n'est pas l'élasticité ». Nous avons donc mesuré l'épaisseur finale de la courbe, à la fin de la douzième minute de pétrissage ; il existe une corrélation entre G et la valeur El mesurée :

$$r_{g,él} = + 0,438 \pm 0,090$$

Cette corrélation est significative avec une valeur $t = 4,0203$ pour 70 degrés de liberté. Et puisqu'il est admis que G mesure l'élasticité de la pâte — dans une certaine mesure — il faut bien admettre que l'épaisseur finale de la courbe farinographique a la même signification.

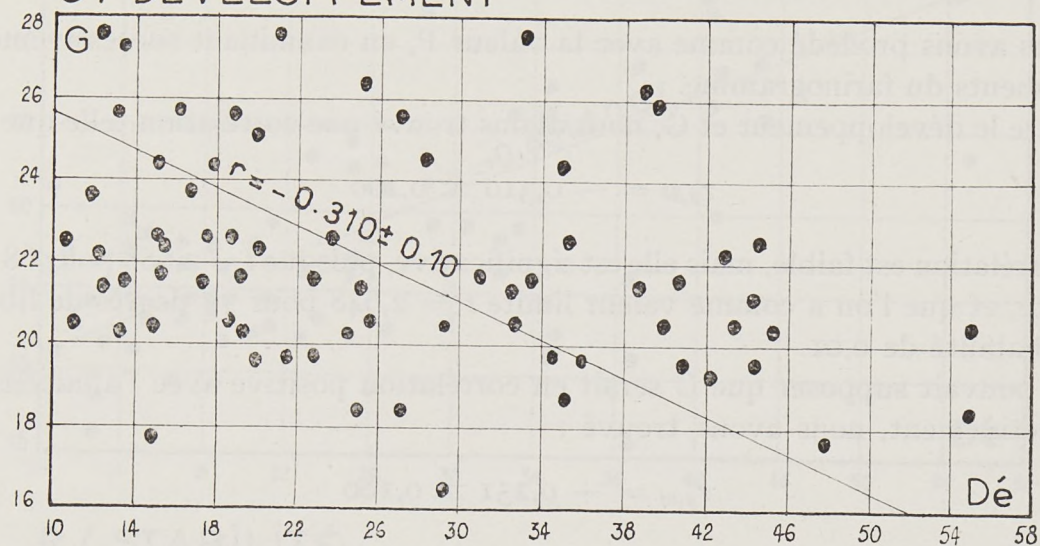
6° Conclusion :

Si l'on rassemble en un tableau réduit tous les coefficients que nous avons calculés, on constate que c'est la stabilité qui donne la meilleure estimation de la valeur P . Il serait possible, en calculant les coefficients de corrélation partiels, de parvenir à une équation de régression multiple de la forme :

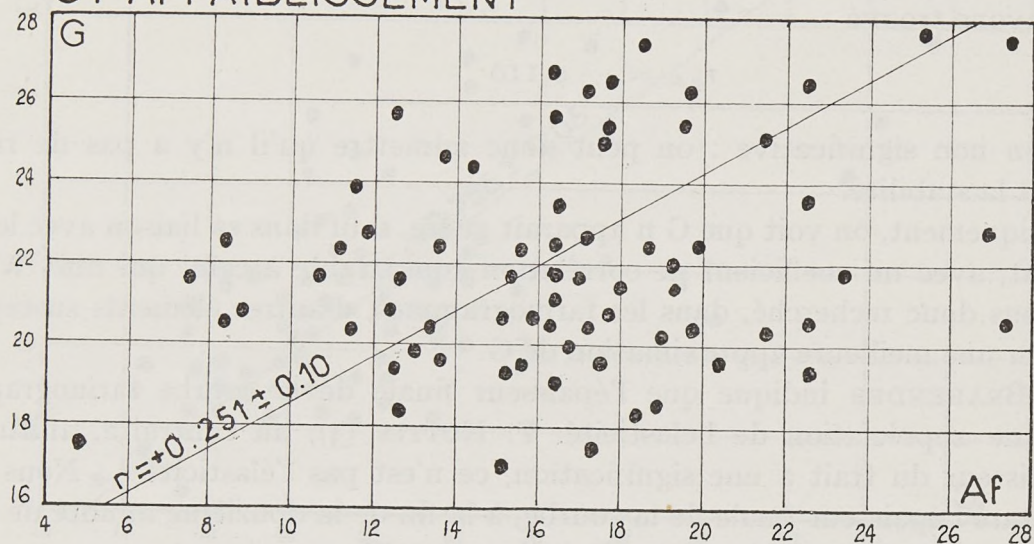
$$P = a + b \cdot Dé + c \cdot St - d \cdot Af$$

a , b , c , et d étant des constantes caractéristiques de l'année étudiée.

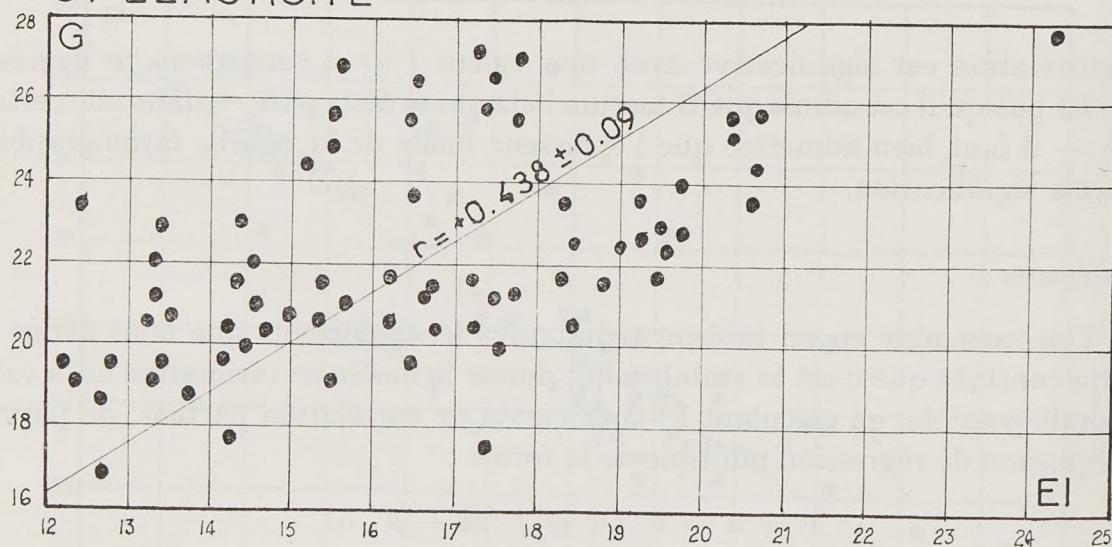
G / DÉVELOPPEMENT



G / AFFAIBLISSEMENT



G / ÉLASTICITÉ



En ce qui concerne G, on voit que ce chiffre apparaît pour une part à peu près identique dans le W et dans le chiffre valorimétrique V. Toutefois, la meilleure approximation de G paraît être donnée par une caractéristique — l'épaisseur de la courbe — dont ne tient pas compte le chiffre valorimétrique.

	P	G
Valorimètre	+ 0,781	— 0,314
Développement	+ 0,601	— 0,310
Stabilité	+ 0,756	— 0,110
Affaiblissement	— 0,697	+ 0,251
Épaisseur finale	→	+ 0,438

L'alvéographe et le farinographe, quoique différant dans leur principe, donnent des indications parallèles ; et il est aisé de passer de l'un à l'autre lorsqu'on connaît la valeur d'une série de témoins, examinés aux deux appareils pour l'année et le lien considérés.

D. — RELATIONS LIANT LES CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DU GRAIN ET LES QUALITÉS PLASTIQUES DE LA PÂTE

1^o *L'influence variétale :*

Dans cette série d'essais, limitée à un petit nombre de variétés comportant, sur le terrain, plusieurs répétitions, on a pu mettre tout d'abord en évidence l'influence variétale. On a retenu, comme causes de variation : la variété, le terrain, et les causes indéterminées (variance résiduelle). L'analyse de la variance, pour les W, était la suivante :

Origine de la variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance
Variétés	135 703,500	24	5 654,3125
Terrain	9 393,837	19	494,4124
Résiduelle	7 455,413	56	133,1323
Total	152 552,750	99	

La valeur F, ou rapport des variances relatives respectivement aux variétés et à l'erreur, atteint 42, 47, ce qui correspond à une probabilité élevée. La précision de l'essai — qui est la plus petite différence significative exprimée pour cent de la moyenne de l'essai —, est médiocre : 17,8 p. 100 de la moyenne seulement. Il faut noter que la précision d'un essai, du point de vue W, est rarement supérieure à cette valeur, alors que ce même essai analysé quant à son rendement, accuse des précisions de l'ordre de 5 à 7 p. 100.

Des « chiffres de dureté », on a retenu seulement le « facteur de force » comme chiffre indicateur de la dureté : rappelons qu'il s'agit de l'ordonnée du diagramme

fourni par le « doseur de dureté ». L'analyse de la variance, effectuée sur le même essai que pour le W, était la suivante :

Origine de la variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance
Variétés.....	289 464	24	12 061,00
Terrain.....	27 446	3	9 148,60
Résiduelle.....	28 554	72	396,58
Total.....	345 464	99	

Bien que l'analyse ait été conduite en blocs aléatoires, et non en lattice carré comme pour le W (ce qui conduit à introduire une partie de l'effet terrain dans l'effet erreur), l'essai est beaucoup plus précis : la précision atteint 4,7 p. 100 de la moyenne, et l'on a $F = 30,41$, ce qui est une valeur très élevée pour le nombre de degrés de liberté considérés. Ainsi, il semble bien que, dans des conditions de culture et de microclimat identiques, la dureté du blé soit, pour une grande part, variétale ; elle serait moins sujette que le W à des variations accidentelles de terrain ou de techniques culturales. C'est là une remarque importante sur laquelle nous reviendrons.

L'analyse granulométrique a conduit à un classement des produits en six catégories ; mais le calcul n'a pas été fait pour chacune des catégories ; il a seulement été effectué pour les particules demeurant sur le tamis de 20 : nous verrons plus loin l'importance de cette fraction qui représente environ 35 à 40 p. 100 du total. L'analyse de la variance, conduite comme pour la dureté, a donné les résultats suivants :

Origine de la variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance
Variétés.....	4 808 169,74	24	20 034,0405
Terrain.....	84 473,40	3	28 157,8000
Résiduelle.....	1 187 024,10	72	16 486,4458
Total.....	6 079 667,24	99	

La plus petite différence significative atteint 3,9 p. 100 de la moyenne générale de l'essai, mais F n'est plus que 1,21 : cependant, la part importante qui revient à la variété est encore mise en évidence, bien que l'influence du terrain ne soit plus, ici, négligeable. Bien que le calcul n'ait pas été effectué, on pourrait prédire des résultats identiques pour les résultats des autres catégories de tamis : le tableau 1 indique d'ailleurs les proportions des différents passages pour l'essai étudié, et l'on voit que les refus varient corrélativement.

L'analyse au farinographe du blé entier finement concassé — selon la méthode exposée au chapitre IV — fournit des chiffres F' pour lesquels on a effectué les mêmes calculs ; les résultats suivants ont été obtenus :

Origine de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance
Variétés.....	274 600,96	24	11 441,7066
Terrain.....	6 287,28	3	2 095,7600
Résiduelle.....	32 096,72	72	445,7877
Total.....	312 984,96	99	

La précision est ici très inférieure à celle des essais précédents : 25,3 p. 100 seulement ; c'est un ordre de grandeur identique à celui trouvé pour le W ; la valeur F relative aux variétés atteint 25,6, ce qui est une valeur très élevée. L'influence variétale est prépondérante.

TABLEAU I

N°	Variété	W	F'	Dureté	Granulométrie					
					> 20	> 30	> 38	> 46	> 70	> 70
1.	N° 11	200,6	161,3	660	4 973	2 136	1 025	408	678	776
2.	N° 12	200,6	166,6	681	4 947	2 164	1 028	408	680	768
3.	N° 13	180,5	160,7	560	4 680	1 993	1 098	516	858	851
4.	N° 15	179,6	156,9	626	4 781	2 083	1 069	462	771	830
5.	N° 14	172,2	162,2	637	4 833	2 021	1 045	513	787	797
6.	N° 18	163,3	134,8	631	4 890	2 031	1 035	440	732	867
7.	N° 10	154,7	151,9	642	5 009	2 118	1 003	416	683	767
8.	N° 16	145,2	120,9	719	4 686	2 113	1 058	443	838	857
9.	N° 19	143,9	118,8	590	4 575	2 028	1 125	516	831	934
10.	N° 23	122,9	103,8	601	4 517	2 016	1 068	482	805	1 009
11.	N° 8	119,4	138,0	637	4 859	1 985	1 038	473	764	881
12.	N° 24	107,6	110,0	532	4 447	1 929	1 104	534	925	1 056
13.	N° 22	101,9	93,5	560	4 696	2 019	1 076	516	836	853
14.	N° 25	100,0	100,0	606	4 629	1 957	1 101	506	833	986
15.	N° 9	99,0	103,8	547	4 599	1 956	1 101	523	878	940
16.	N° 21	94,9	92,6	600	4 626	2 058	1 124	523	858	827
17.	N° 17	85,0	91,4	537	4 743	2 132	1 080	467	783	791
18.	N° 7	81,8	86,7	615	4 543	1 975	1 094	532	862	989
19.	N° 20	70,0	61,3	627	4 285	2 087	1 166	557	922	978
20.	N° 1	66,5	78,7	531	4 513	1 933	1 098	546	927	977
21.	N° 2	66,2	33,5	547	3 290	2 016	1 145	555	936	1 054
22.	N° 5	63,6	69,0	510	4 406	1 859	1 069	557	957	1 147
23.	N° 3	61,4	63,1	521	4 622	1 962	1 095	536	866	914
24.	N° 6	61,1	33,9	546	4 139	1 977	1 152	571	1 507	1 101
25.	N° 4	46,1	63,1	525	4 410	1 988	1 086	510	837	1 164
<i>d</i> (0,05).....		17,8	25,3	4,7	3,9					

La plus petite différence significative est exprimée pour cent de la moyenne de la valeur considérée. Les chiffres granulométriques sont exprimés ‰ du total.

On peut conclure de ces premiers résultats que les caractéristiques étudiées sont essentiellement variétales ; peut-être faut-il toutefois en excepter l'analyse granulométrique. Ces caractéristiques sont plus ou moins précises, parce qu'elles sont plus ou moins sujettes à des accidents de végétation ou de manipulation : il est évident que l'appréciation de la dureté est plus simple à exécuter que celle du W ou du chiffre F'.

Comparés aux chiffres de W et de dureté, les chiffres granulométriques sont affectés d'une faible variation ; il n'en est pas moins qu'ils sont hautement significatifs, et permettent le classement des variétés : ce sont les refus du tamis de 20, et les dessous du tamis de 70, qui permettent le meilleur classement.

2° La dureté du grain de blé :

On peut penser tout d'abord que vitrosité et dureté ont quelque parenté ; c'est pourquoi, au cours de nos essais, nous avons apprécié pour chaque échantillon, la vitrosité du grain en examinant la cassure ; nous avons voulu connaître l'inten-

sité de la liaison entre dureté et vitrosité du grain, étant entendu que l'humidité du grain était identique dans tous les cas. Puis nous avons examiné les rapports de la dureté avec la granulométrie et les qualités plastiques.

Nous avons mis en évidence, entre vitrosité et dureté du grain, une corrélation positive et significative, mais moins élevée qu'on aurait pu le croire. C'est probablement, au premier chef, parce que l'appréciation de la vitrosité est assez subjective, et relativement peu précise ; mais d'autre part, certains blés non vitreux sont plus durs à moudre que d'autres plus vitreux ; c'est le cas, en particulier, des lots fortement mitadinés où peu de grains sont réellement vitreux, mais où tous présentent des plages cornées très dures ; les valeurs suivantes ont été établies :

$$r_{dv} = + 0,366 \pm 0,086$$

avec $t = 4,1835$, ce qui est significatif pour le nombre de couples étudiés qui était égal à 100. Les caractéristiques de dispersion étaient les suivantes :

	Moyenne	Écart-type	Coefficient de variation
Dureté	585,40	59,9430	10,23
Vitrosité	3,46	3,7844	109,24

Il est probable qu'une meilleure appréciation de la vitrosité, à l'aide d'un farinotome par exemple, aurait permis de réduire considérablement le coefficient de variation de la vitrosité.

C'est ensuite les rapports de la dureté et de la mouture qui ont retenu notre attention : lors de la mouture au moulin BRABENDER, on voit presque toujours les blés qu'on juge les plus vitreux, donner le plus de farines de broyage (dessous de 10 XX après B 1, sur la figure 1). Effectivement, nous avons trouvé une bonne corrélation inverse entre la dureté et la proportion de farines de broyage à la mouture :

$$r = - 0,773 \pm 0,040$$

avec une valeur de $t = 19,013$, ce qui est hautement significatif pour 100 couples de mesures. Les caractéristiques de dispersion étaient les suivantes :

	Moyenne	Écart-type	Coefficient de variation
Farines de broyage	93,40	14,117	15,11
Dureté.....	585,10	59,943	10,24

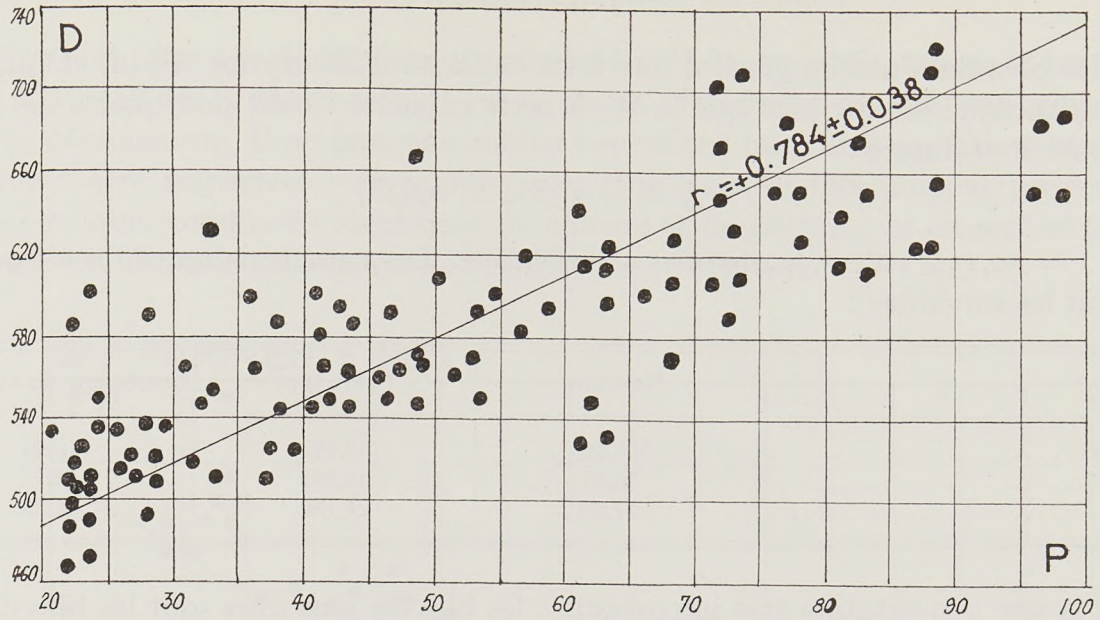
Enfin, il était essentiel de comparer dureté et qualités plastiques des pâtes : nous avons comparé les chiffres de dureté des blés, d'une part, et les W des pâtes faites avec les farines provenant de ces blés ; par la suite, nous avons comparé la dureté et les P alvéographiques de ces pâtes.

Pour la corrélation entre dureté et W, nous avons obtenu :

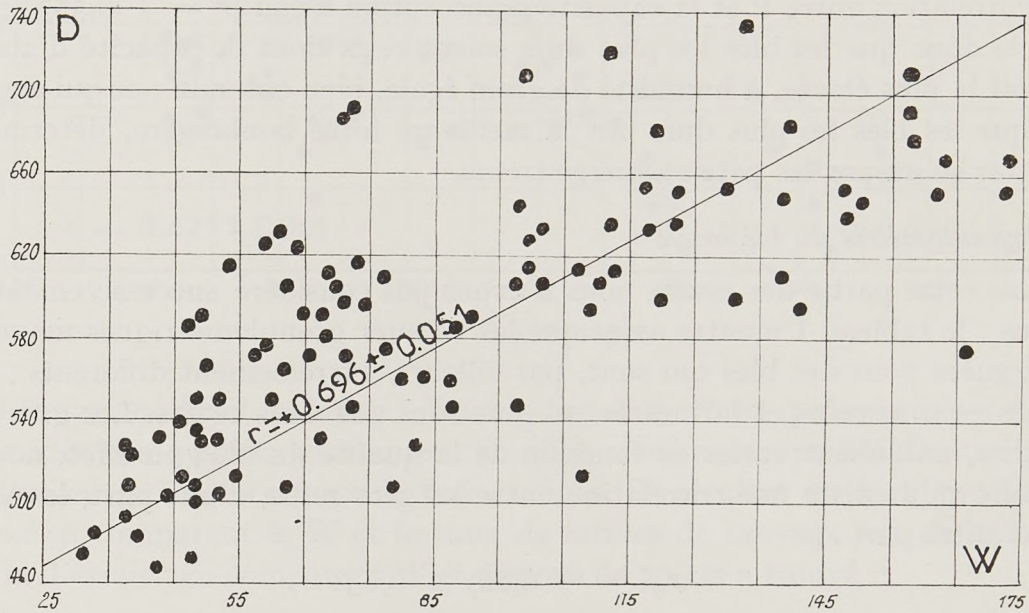
$$r_{dw} = + 0,696 \pm 0,051$$

avec $t = 13,363$, ce qui est hautement significatif. Mais on sait, d'autre part, que les

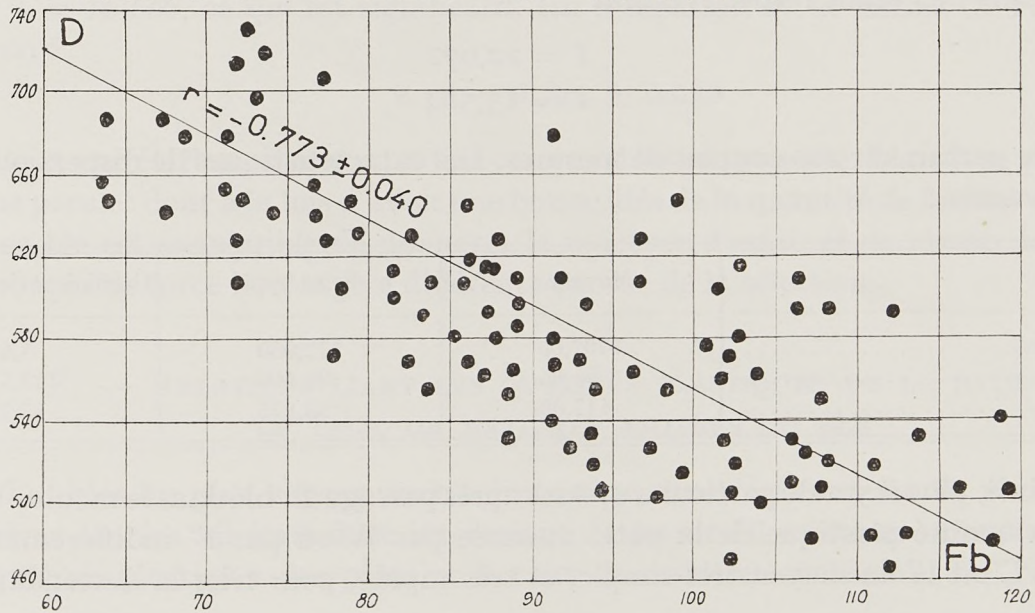
DURETÉ / P



DURETÉ / W



DURETÉ / FARINES DE BROUAGE



blés les plus durs ont en général une forte capacité d'absorption d'eau, et que le P alvéographique est lié, plus que le W, à cette capacité : c'est pourquoi nous avons comparé P et dureté :

$$r_{dp} = + 0,784 \pm 0,038$$

avec $t = 20,139$, valeur hautement significative. Les caractéristiques de dispersion étaient les suivantes :

	Moyenne	Écart-type	Coefficient de variation
Dureté.....	585,40	59,943	10,24
W.....	90,05	39,093	43,41
P.....	47,65	21,136	44,35

C'est là une constatation très importante : les blés les plus durs sont les blés dont le P est le plus élevé. Nous avons trouvé précédemment (au paragraphe C) une assez bonne corrélation entre P et la capacité d'absorption d'eau ($r = + 0,553 \pm 0,080$). Il semble donc que les blés les plus durs soient ceux dont la capacité d'absorption d'eau soit la plus élevée, à humidité de grain égale, bien entendu ; ce qui reviendrait à dire que les blés les plus durs ont la meilleure force boulangère, déterminée par l'alvéographe ou par les pétrins enregistreurs.

3° La granulométrie du blé broyé :

Dans cette partie des essais, nous n'avons pas considéré successivement chacun des refus : le tableau I montre assez que les valeurs granulométriques moyennes ne varient guère pour des blés qui sont, par ailleurs, extrêmement différents ; mais les extrêmes — gros refus et farines fines — ne sont pas dans ce cas. Les gros refus en particulier, paraissent varier en fonction de la qualité du blé ; en effet, nous avons pu établir qu'il existe une corrélation entre les gros refus, d'une part, les chiffres F' et W, d'autre part :

$$r_{rf'} = + 0,827 \pm 0,031$$

$$r_{rw} = + 0,700 \pm 0,051$$

les valeurs de t étant respectivement

$$t = 22,672$$

$$t = 13,584$$

L'étude portait sur 200 couples de mesures. Les caractéristiques de dispersion étaient les suivantes :

	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation
Gros refus.....	3 707,00	172,050	4,64
W'.....	90,05	39,093	43,41
F'.....	117,00	55,875	47,75

Ainsi, plus il y a de particules grosses après passage du blé dans le moulin-broyeur, plus la qualité plastique de la pâte, mesurée par W ou par F' indifféremment, est élevée. C'est là un moyen très simple, et très rapide, pour trier la descendance d'un

croisement : passage du blé dans un moulin à café de comptoir, tamisage sur le tamis N° 20, pesée des produits restant sur ce tamis, classement des blés par ordre de gros refus décroissants. Il ne faut pas oublier cependant que deux conditions essentielles doivent être respectées : en premier lieu, que tous les blés doivent provenir d'un essai unique (conditions identiques de culture et de climat) ; et en second lieu, que l'humidité des échantillons doit être strictement identique.

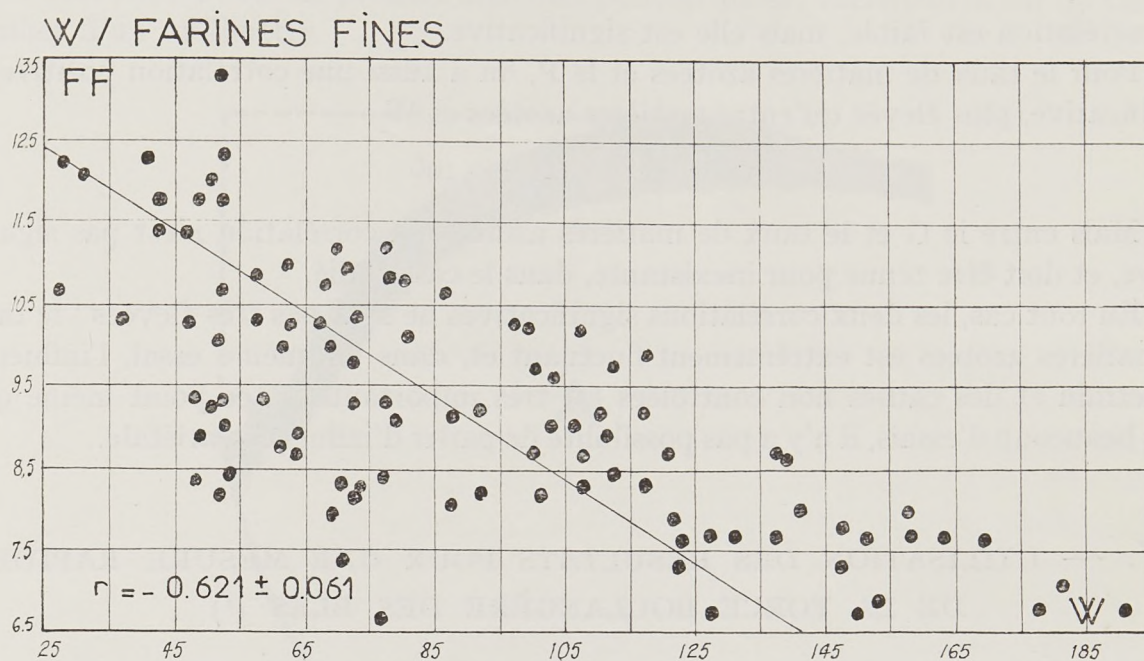


PLANCHE 5.

Les farines fines, passant à travers le tamis n° 70, peuvent aussi donner une bonne idée des qualités plastiques ; en effet, nous avons pu établir une corrélation négative entre W et ce taux de farines fines. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu en comparant le W et le taux de farines de broyage lors de la mouture au moulin d'essais : en comparant W et dessous de 70, on a trouvé :

$$r = -0,621 \pm 0,061$$

avec $t = 10,006$, ce qui est significatif. En comparant W et farines de broyage, on a trouvé :

$$r = -0,773 \pm 0,040$$

Les deux corrélations sont tout à fait comparables en intensité. L'analyse granulométrique permet donc à la fois d'avoir une bonne idée de la quantité de farines de broyage que ce blé est susceptible de donner à la mouture d'essai, et de classer les variétés en groupes de force boulangère différente en vue de la sélection.

E. — RELATIONS LIANT LES QUALITÉS PLASTIQUES DE LA PÂTE ET LE TAUX DE MATIÈRES AZOTÉES DU BLÉ

Les blés les plus vitreux sont à juste titre considérés comme les plus riches en matières azotées : il était donc intéressant de savoir s'il existe une corrélation entre les qualités plastiques des pâtes et le taux de matières azotées du blé. Nous avons

vu précédemment que les blés les plus durs, les plus vitreux, sont ceux dont les qualités plastiques sont les plus élevées ; on pouvait donc s'attendre à ce que le taux de matières azotées soit corrélatif du W et du P alvéographiques ; en effet, nous avons établi les corrélations suivantes :

Pour le taux de matières azotées et le W, on a :

$$r_{nw} = + 0,394 \pm 0,127$$

La corrélation est faible, mais elle est significative.

Pour le taux de matières azotées et le P, on a aussi une corrélation positive et significative, plus élevée qu'entre matières azotées et W :

$$r_{np} = + 0,541 \pm 0,106$$

Mais entre le G et le taux de matières azotées, la corrélation n'est pas significative, et doit être tenue pour inexistante, dans le cas étudié.

En tout cas, les deux corrélations significatives ne sont pas très élevées : le taux de matières azotées est extrêmement fluctuant et, dans un même essai, l'influence du terrain et des causes non contrôlées est très importante ; à ce point même que dans beaucoup d'essais, il n'y a pas possibilité de parler d'influence variétale.

IV. — UTILISATION DES RÉSULTATS POUR UNE MESURE RAPIDE DE LA FORCE BOULANGÈRE DES BLÉS ⁽¹⁾

Dans les essais dont nous avons exposé les résultats, une valeur essentielle paraît à tous les pas : la valeur P de l'alvéographe ; c'est elle qui est en corrélation la plus étroite avec l'absorption d'eau, le W, les caractéristiques physiques du grain, le taux de matières azotées. En bref, c'est dire que la capacité d'absorption d'eau est une qualité essentielle, et que c'est de ce côté qu'il faut chercher toute méthode nouvelle qu'on voudrait voir liée au W alvéographique.

Nous avons longtemps utilisé la méthode de PELSSENKE pour examiner nos lignées de blé. Malheureusement, si la concordance entre chiffres PELSSENKE et W est bonne pour les valeurs très faibles ou très élevées, il n'en est pas moins impossible de faire un classement dans les valeurs moyennes, si l'on veut garder le W comme référence. Nous avons donc cherché une méthode qui, mettant en œuvre une quantité réduite de grains finement broyés (mouture entière) fût rapide et donnât un classement identique à celui fourni par l'alvéographe. Or, il est impossible de concevoir l'utilisation de mouture entière par l'alvéographe ; mais l'alvéographe donnant des résultats comparables à ceux fournis par les pétrins enregistreurs, on pouvait utiliser ces derniers. P. NOTTIN (3) avait déjà proposé une méthode semblable : « On peut imaginer de broyer finement le blé, comme dans la méthode de Pelschenke, et de faire un essai dans le pétrin enregistreur avec cette boulangue. Je ne pense pas que cette méthode ait été essayée... »

Le principe de l'essai est simple : confectionner une pâte avec la mouture entière (boulangue) et une quantité d'eau constante, et enregistrer l'énergie consommée pendant le pétrissage.

(1) Ce chapitre a été exposé à l'Académie d'Agriculture de France, par M. le Professeur NOTTIN, le 19 janvier 1955.

A. — MATIÈRE PREMIÈRE

La matière première est constituée par 55 grammes de blé parfaitement propre, sans terre ni débris de paille ; pour les essais, nous avons veillé à n'utiliser que des blés sains, non échaudés. L'échantillon est broyé successivement dans deux moulins à céréales Peugeot : le premier moulin donne un produit grossièrement broyé, le second finit l'opération. Le produit final doit pouvoir passer entièrement sur un tamis à mailles d'un millimètre.

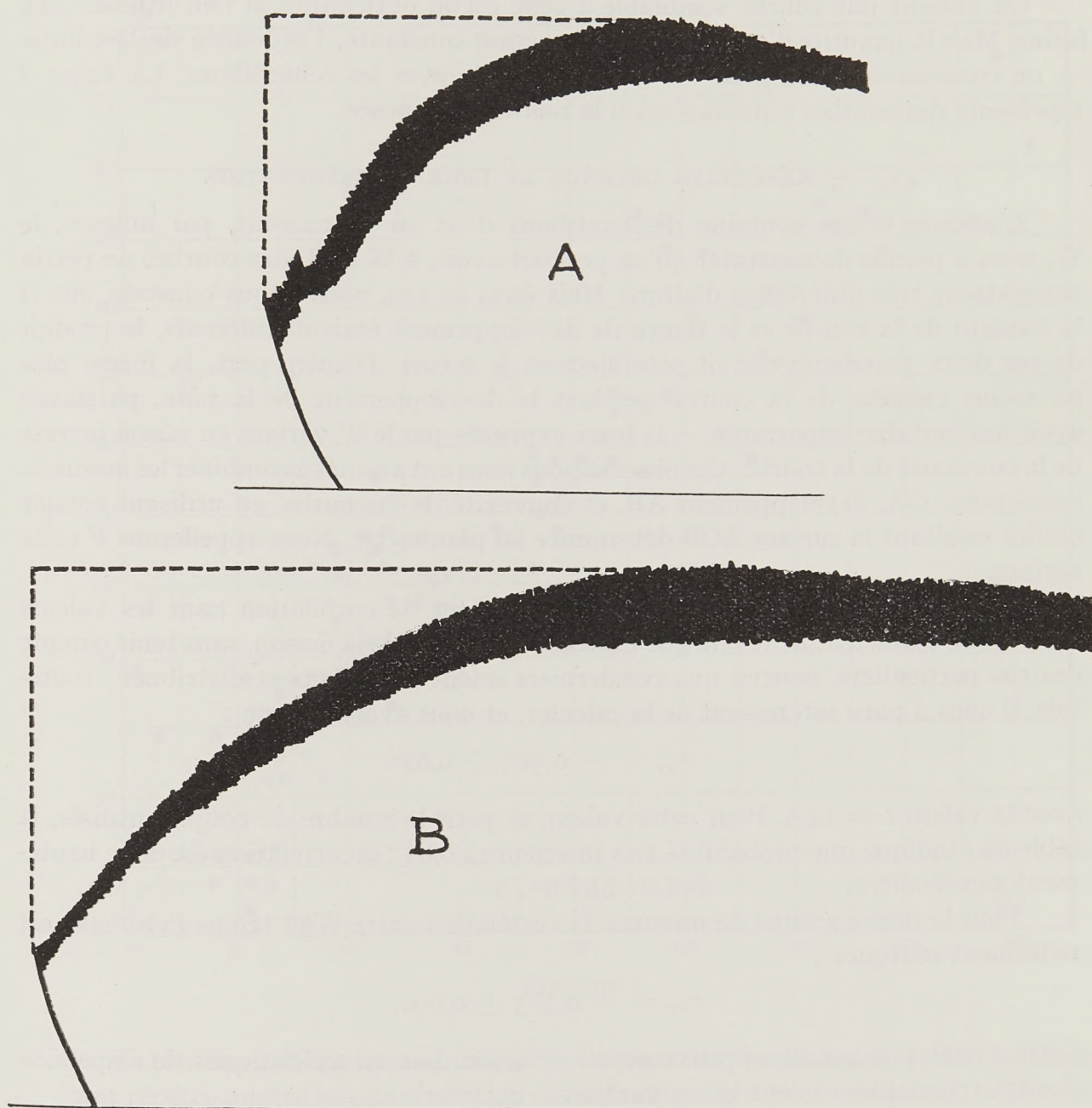


FIG. 8. — Courbes obtenues au pétrin enregistreur travaillant sur blé entier broyé.

A représente la courbe d'un blé dont le W est 65 ; et B représente celle d'un blé dont le W est 141

Avant la mouture, on rassemble les échantillons dans une même enceinte, afin d'opérer sur des blés ayant approximativement la même humidité (à quelques dixièmes près).

B. — MODE OPÉRATOIRE

On pèse avec soin exactement 50 grammes de produit broyé, et on les introduit dans le pétrin enregistreur. Il est entendu que l'on travaille dans les conditions normales d'utilisation de l'appareil (température du pétrin réglée à 30°C, eau d'hydratation à la température de la pièce, etc.). Après la mise en route de l'enregistreur, on ajoute au produit 70 p. 100 d'eau distillée, soit 35 centimètres cubes. Ce chiffre de 70 p. 100 a été déterminé par tâtonnements, pour obtenir une consistance de 500 unités Brabender pour un blé du type Vilmorin 27.

On obtient une courbe semblable à celle qu'on obtiendrait si l'on utilisait une farine. Mais la quantité d'eau d'hydratation étant constante, l'ordonnée de la courbe — ou consistance de la pâte — devient variable avec les échantillons. La *figure 8* représente des courbes obtenues selon la méthode proposée.

C. — RÉSULTATS OBTENUS ET LEUR INTERPRÉTATION

L'examen d'une centaine d'échantillons dont on connaissait, par ailleurs, le W, nous a permis de constater qu'on pouvait avoir, à W égal, des courbes de pétrin enregistreur très différentes d'allure. Mais dans ce cas, nous avons constaté que si la hauteur de la courbe et le temps de développement étaient différents, le produit de ces deux grandeurs restait sensiblement le même. D'autre part, la forme plus ou moins convexe de la courbe pendant le développement de la pâte, paraissait avoir une certaine importance — la force exprimée par le W variant en raison inverse de la convexité de la courbe. Ces observations nous ont amenés à combiner les mesures : consistance OA, développement AB, et convexité de la courbe, en utilisant comme chiffre résultant la surface AOB déterminée au planimètre. Nous appellerons F cette surface.

Nous avons tout d'abord calculé le coefficient de corrélation liant les valeurs W et F. Ce coefficient ne révèle que l'intensité générale de la liaison, sans tenir compte des cas particuliers, pourvu que ces derniers soient normalement distribués ; toutefois, il nous a paru intéressant de la calculer, et nous avons obtenu :

$$r_{wf} = + 0,903 \pm 0,018$$

avec la valeur $t = 14,5$. Pour cette valeur, et pour le nombre de couples utilisés, la table de t indique une probabilité très inférieure à 0,01 : la corrélation est donc hautement significative.

Pour le même groupe de mesures, la corrélation entre W et temps Pelshenke est nettement marquée :

$$r_{wp} = + 0,583 \pm 0,090$$

Cette corrélation est significative avec $t = 4,982$. Les caractéristiques de dispersion des trois variables étaient les suivantes :

	Moyenne	Écart-type
W	109,48	49,38
F	103,10	44,50
P	47,00	35,38

Pour la corrélation entre W et F, l'équation de régression de F en W est :

$$W = 0,988 F' + 7,168$$

Pour chiffre définitif, nous avons donc utilisé un chiffre F' tel que :

$$F' = (F \times 0,988) + 7,618$$

afin qu'il ait le même ordre de grandeur que le W.

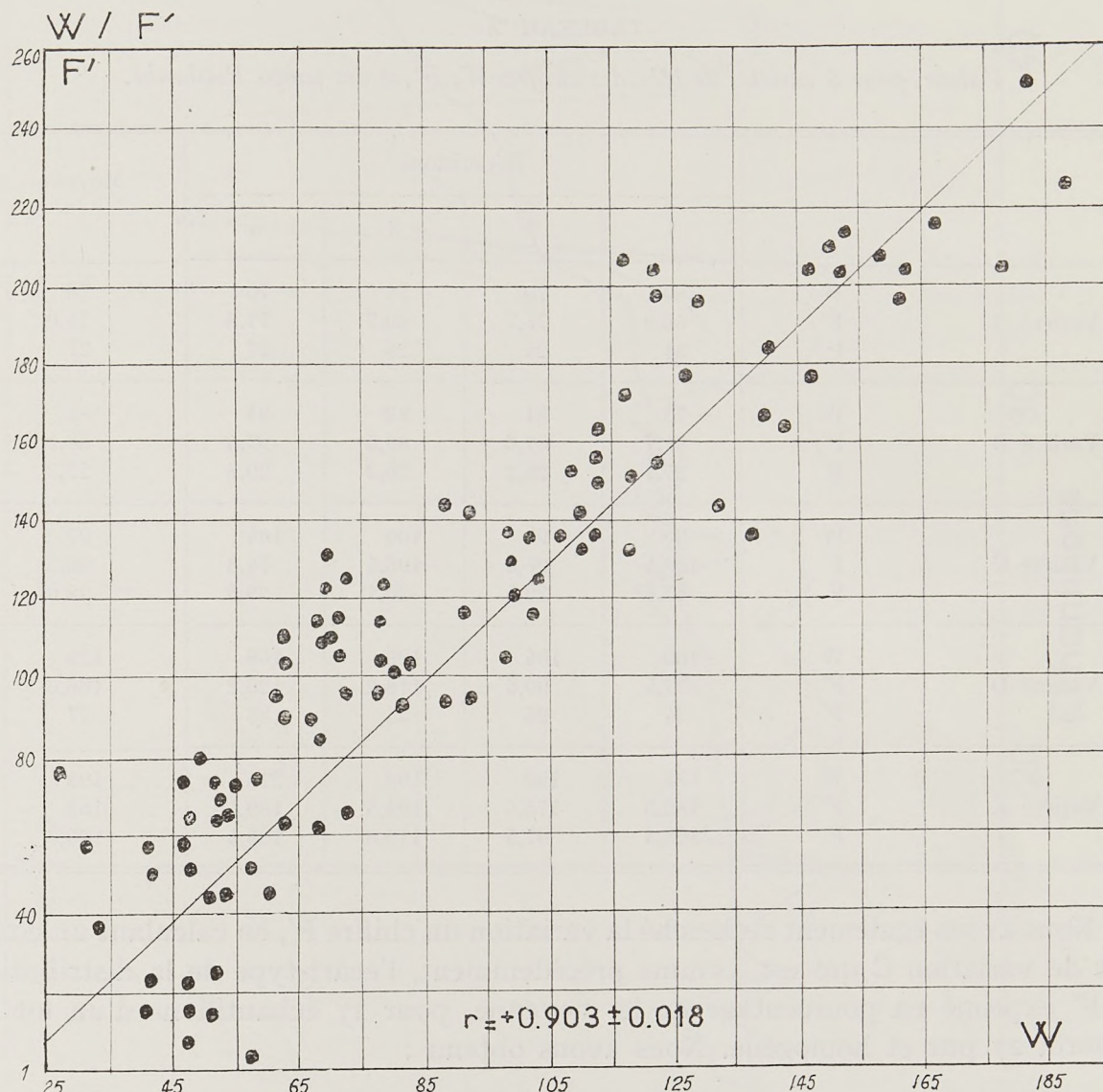


PLANCHE 6.

Le tableau 2 donne les mesures obtenues pour cinq variétés de blé, chaque variété étant répétée quatre fois (la répétition constituait sur le terrain une parcelle distincte). W est le chiffre alvéographique, F' le chiffre défini précédemment, et P le temps Pelshenke.

Si l'on classe les blés selon leur valeur F', on parvient à un ordre identique au classement par le W ; toutefois les valeurs élevées sont sensiblement plus faibles, mais il devient possible de distinguer des blés ayant des W de 70, 100 et davantage, tandis que le chiffre Pelshenke ne fait aucune différence entre des blés variant de 70 à 125 de W.

Le chiffre F' donne donc une meilleure correspondance avec le W que le temps Pelshenke : la figure 9 permet d'ailleurs de s'en rendre compte : on y a classé, par ordre croissant de W , 50 échantillons, en portant sur la même ordonnée W , chiffres F' , et Pelshenke ; on remarquera la variation fortement discontinue du chiffre Pelshenke' où il arrive que des blés dont les W atteignent respectivement 65 et 120 aient le même classement. Notons toutefois l'arbitraire d'une telle représentation puisque, pour une même variété, le W lui-même est loin d'être une valeur définie sans fluctuation aucune.

TABLEAU 2

Valeur, pour 5 variétés de blés, des chiffres W , F' , et des temps Pelshenke.

		Répétitions				Moyenne
		1	2	3	4	
Variété A	W	60	70	74	76	70
	F'	66,9	76,7	80,7	71,8	74,0
	P	31	24	26	27	27
Variété B	W	75	81	83	91	82
	F'	81,7	87,6	89,5	97,5	89,1
	P	27,1	26,2	26,2	29,8	27,3
Variété C	W	90	95	100	104	97
	F'	108,4	96,5	106,4	74,8	96,5
	P	27,6	29,1	26,1	29,3	28,0
Variété D	W	100	104	129	168	125
	F'	97,5	90,6	118,2	120,2	106,6
	P	24	26	25	35	27
Variété E	W	182	190	193	215	195
	F'	182,5	175,6	108,5	189,4	182
	P	128,3	97,5	119,0	138,4	120,8

Nous avons également recherché la variation du chiffre F' , en calculant un coefficient de variation C qui est, comme précédemment, l'écart-type de la distribution des F' exprimé en pourcentage de la moyenne, pour 27 échantillons d'un lot de Vilmorin 27 pur et homogène. Nous avons obtenu :

$$C = 3,810$$

Cette valeur est, à peu de choses près, identique à celle qu'on obtient en utilisant normalement le pétrin enregistreur (en l'occurrence, le farinographe de BRABENDER) avec de la farine. Les courbes obtenues avec Vilmorin 27 étaient d'ailleurs pratiquement superposables.

D. — UTILISATION DE LA MÉTHODE POUR LA SÉLECTION

La méthode proposée paraît intéressante parce qu'elle reflète, mieux que la méthode de PELSHENKE, les qualités plastiques de la pâte telles que les exprime le W (le W étant, en France, la seule expression légale de la force boulangère).

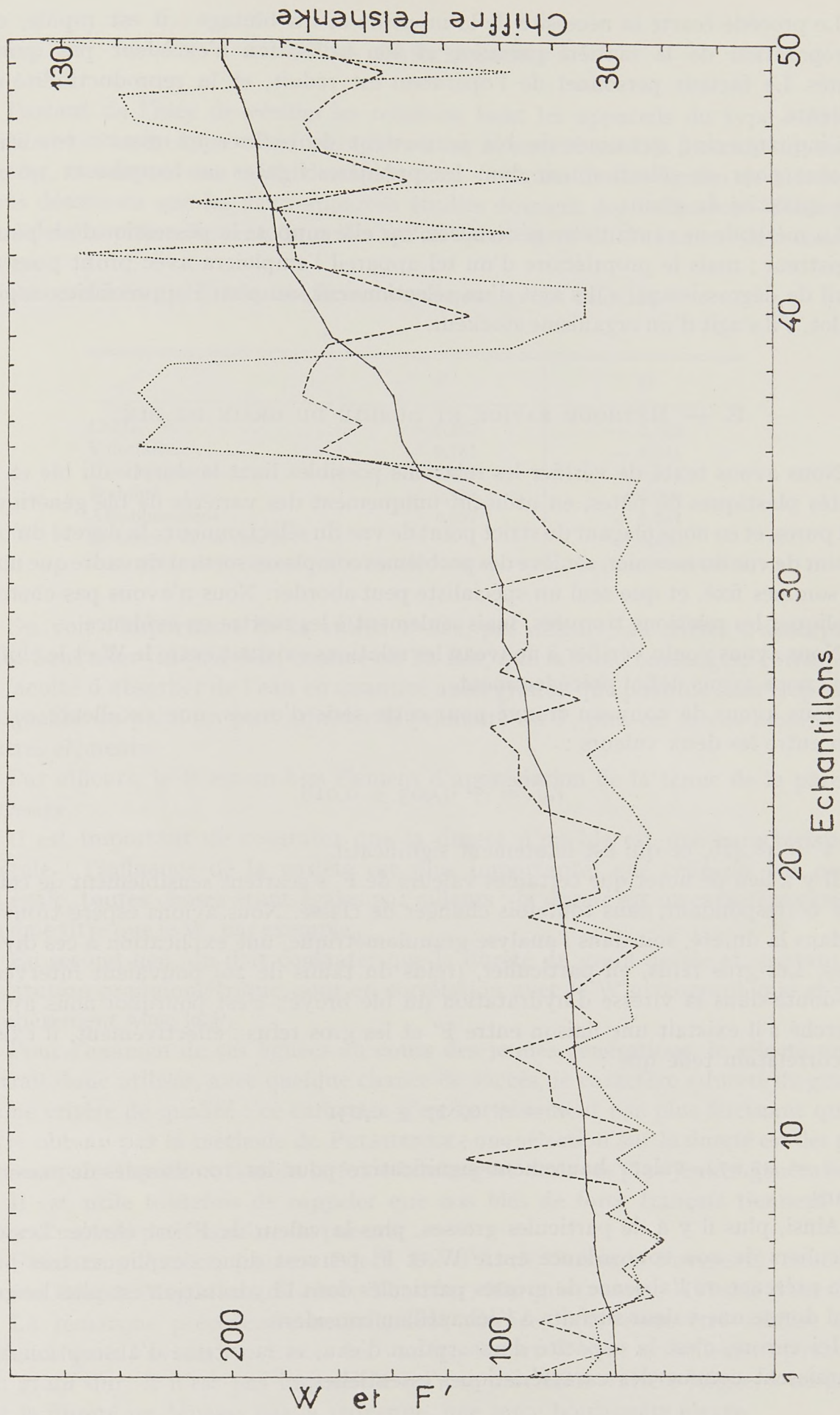


FIG. 9. — Classement de 50 variétés de Blé par ordre de W croissants, avec les chiffres F' et les chiffres Pelskenke correspondants

Le procédé écarte la nécessité de la mouture et du blutage ; il est rapide, car la préparation de la matière première et son utilisation n'excèdent pas quinze minutes. Le facteur personnel de l'opérateur est réduit, et la reproductibilité est excellente.

Cinquante-cinq grammes de blé permettent de réaliser un essai : condition précieuse pour un sélectionneur dont les premières lignées ne fournissent qu'une petite quantité de grains.

La méthode ne saurait être généralisée, car elle suppose la possession d'un pétrin enregistreur ; mais le propriétaire d'un tel appareil l'emploiera avec profit pour un travail de dégrossissage, s'il s'agit d'un sélectionneur, ou pour l'appréciation rapide d'un lot, s'il s'agit d'un organisme stockeur.

E. — MÉTHODE RAPIDE ET DURETÉ DU GRAIN DE BLÉ

Nous avons tenté de vérifier les relations possibles liant la dureté du blé et les qualités plastiques de pâtes, en utilisant uniquement des variétés de blé génétiquement pures, et en nous plaçant du strict point de vue du sélectionneur : la dureté du blé, du point de vue du meunier, soulève des problèmes complexes sortant du cadre que nous nous sommes fixé, et que seul un spécialiste peut aborder. Nous n'avons pas cherché à expliquer les relations trouvées, mais seulement à les mettre en évidence.

Nous avons voulu vérifier à nouveau les relations existant entre le W et le chiffre F' que nous avons défini précédemment.

Nous avons de nouveau trouvé pour cette série d'essais, une excellente corrélation entre les deux valeurs :

$$r_{wf'} = + 0,903 \pm 0,018$$

avec $t = 48,426$, ce qui est hautement significatif.

Il y a lieu de noter que certaines valeurs de F' s'écartent sensiblement de celles du W correspondant, sans toutefois changer de classe. Nous avions espéré trouver, soit dans la dureté, soit dans l'analyse granulométrique, une explication à ces divergences. Les gros refus, en particulier, (refus du tamis de 20) pouvaient intervenir sans doute dans la vitesse d'hydratation du blé broyé ; c'est pourquoi nous avons recherché s'il existait une liaison entre F' et les gros refus ; effectivement, il existe une corrélation telle que :

$$r = + 0,827 \pm 0,031$$

avec $t = 22,672$, valeur hautement significative pour les 100 couples de mesures retenus.

Ainsi, plus il y a de particules grosses, plus la valeur de F' est élevée. Les cas particuliers de non concordance entre W et F' peuvent donc s'expliquer très bien par la présence ou l'absence de grosses particules dont l'hydratation est plus longue, ce qui donne une valeur surfaite à l'échantillon considéré.

Ici encore, c'est la capacité d'absorption d'eau, et la vitesse d'absorption, qui apparaissent comme des caractéristiques essentielles.

V. — CONCLUSIONS

Partant de l'idée de vérifier les relations liant les appareils du type « Alvéographe » et ceux du type « Farinographe » nous avons été amenés à concevoir, expérimenter, et adopter une méthode rapide pour l'examen de nos lignées de blé. Nous savons désormais que les deux appareils étudiés donnent des indications identiques — en dehors naturellement de celles qu'on peut tirer de l'examen des courbes mêmes.

Rassemblons en effet les coefficients que nous avons calculés.

	P	G
Chiffre W	+ 0,887	— 0,303
Valorimètre	+ 0,781	— 0,314
Développement	+ 0,601	— 0,310
Stabilité	+ 0,756	— 0,000
Affaiblissement	— 0,697	+ 0,261
Épaisseur de la courbe	—	+ 0,438

On voit l'importance de la valeur P liée, par ailleurs, au chiffre d'absorption d'eau. Sans aller jusqu'à dire, comme on l'a fait, que la force boulangère correspond à la faculté d'absorber de l'eau en quantité aussi grande que possible sans trop nuire à la qualité du pain, on peut affirmer la primauté du P, plus ou moins modifié par d'autres éléments.

Par ailleurs, le P est un bon élément d'appréciation de la tenue de la pâte au pétrissage.

Il est important de constater que la dureté d'un blé est une caractéristique variétale : l'influence de la variété est plus importante, que celle du sol, ou au plus égale, toutes choses étant égales par ailleurs ; la dureté est un caractère variétal au même titre que le W, par exemple.

En second lieu, on doit constater que la dureté du grain de blé et, partant, sa constitution granulométrique, sont en corrélation avec le W alvéographique et plus singulièrement avec le P.

Pour l'examen de ses lignées au cours des jeunes générations, le sélectionneur pourrait donc utiliser, avec quelque chance de succès, le caractère « dureté du grain » comme critère de qualité : ce caractère n'est certainement pas plus fluctuant que le chiffre obtenu par la méthode de PELSSENKE ; une sélection sur la dureté est des plus efficaces pour l'amélioration de la force boulangère dans les plus jeunes générations.

Il est utile toutefois de rappeler que nos blés de force français tiennent leur valeur d'un très petit nombre de parents :

Florence x Aurore, (comme Pilote, Blé d'Avril, Suzanne Favereau), Szeckacz (comme Dômes, Magdalena, Miche) ; Thatcher, Marquis (comme Hybride d'Avrillé).

La remarque précédente, actuellement vérifiée, doit donc être admise avec prudence pour l'avenir ; si toutes les variétés à fort W sont actuellement pourvues d'un grain dur, il n'est pas impossible qu'une prochaine variété joigne, à un grain dont la dureté ne dépasse pas la moyenne, une force boulangère élevée.

Il reste cependant que dans un croisement mettant en cause deux blés ayant respectivement un bon et un mauvais W, la dureté demeure un critère important pour un tri à effectuer dans la descendance.

Reçu pour publication en mars 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) FISHER R. A., 1947. *Les méthodes statistiques adaptées à la recherche scientifique*, 324 p. Presses Universitaires de France, Paris.
- 2) LATHOUWERS V., 1942. *Manuel de l'amélioration des plantes cultivées*. Tome II. L'Amélioration du froment, 576 p. Librairie Agricole de la Maison Rustique, Paris.
- 3) NOTTIN P., 1940. *Le Blé, la Farine, le Pain*, 192 p. Hachette, Paris.
- 4) Observations sur les caractéristiques propres des blés de la récolte 1951. Laboratoire d'études et de contrôle de la qualité des blés français (I. N. R. A.), 1951. *Bull. Ec. Franç. Meun.*, **126**, 201-202.
- 5) Observations sur les blés de la récolte 1953, 1953. *Bull. Ec. Franç. Meun.*, **138**, 261-266.
- 6) SAUNDERS Ch.-E., 1911. Production de variétés de blé de haute valeur boulangère. *IV^e Conf. Internat. Génét.*, Paris.

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 22-8-1961.

Dépôt légal : 3^e trimestre 1961.

N^o d'impression : 862.

ÉVOLUTION DE LA TENEUR DU LAIT STÉRILISÉ EN RIBOFLAVINE ET EN VITAMINE A AU COURS D'UNE CONSERVATION DE LONGUE DURÉE

J. CAUSERET, D. HUGOT, C. GOULAS-SCHOLLER et G. MOCQUOT

*Laboratoire d'Études sur la Nutrition, 16 rue de l'Estrapade, Paris.
Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine et Oise).*

SOMMAIRE

Les auteurs ont étudié l'évolution, au cours d'une conservation de 6 mois, de la teneur en riboflavine, en vitamine A et en caroténoïdes totaux, du lait stérilisé en bouteilles de verre blanc, conservées :

- au réfrigérateur (+ 4°C), dans l'obscurité ;
- à 20°C, dans l'obscurité ;
- à 20°C, avec exposition à une lumière diffuse ;
- à 38°C, dans l'obscurité ;
- à 38°C, avec exposition à la lumière solaire directe et éclairage artificiel continu.

1° La riboflavine est stable, dans toutes les conditions de température étudiées, si le lait est maintenu dans l'obscurité. Mais, le séjour à la lumière la détruit : après 2 semaines d'exposition à une lumière diffuse, à + 20°C, la perte dépasse déjà 80 p. 100.

2° La vitamine A est stable, si le lait est maintenu dans l'obscurité et si la température n'est pas trop élevée. Mais dans l'obscurité et à + 38°C, elle disparaît dans une proportion de 25 p. 100 après 2 semaines et de 50 p. 100 après 6 semaines, la perte n'augmentant plus ensuite.

D'autre part, le séjour à une lumière diffuse (à + 20°C) ou à une lumière directe (à + 38°C) entraîne des pertes de vitamine A importantes, mais moins rapides que les pertes de riboflavine (40 p. 100 après 2 semaines, plus de 80 p. 100 après 6 semaines).

3° Les caroténoïdes totaux sont stables dans toutes les conditions expérimentales réalisées.

4° Ces constatations confirment que la principale précaution à prendre, pour assurer le maintien du potentiel vitaminique du lait stérilisé, consiste à le placer à l'abri de la lumière même diffuse. Mais elles montrent aussi que, pour prévenir toute perte de vitamine A, il est nécessaire d'éviter les températures trop élevées.

I. — INTRODUCTION

L'influence des conditions de conservation du lait stérilisé sur sa valeur nutritive a été beaucoup moins étudiée que celle des procédés de préparation. En ce qui concerne sa valeur vitaminique, il semble qu'un seul travail d'ensemble ait été publié jusqu'ici : celui de MIJLL, DEKKER et ENGEL (1), dont les résultats essentiels seront mentionnés plus loin.

TABLEAU I

*Influence des conditions de conservation du lait (lumière et température)
sur son taux de riboflavine (1).*

Références	Lait utilisé et conditionnement	Conditions expérimentales et résultats
PETERSON et collab., 1944 (2).	Lait cru en bouteilles de verre blanc (de 1 pinte).	a) Exposition à la lumière solaire directe au milieu de la journée (temp. 15°5-22°C) — en 30 minutes, perte de 28 % ; — en 90 minutes, perte de 50 % ; — en 120 minutes, perte de 66 % ; — en 210 minutes, perte de 72 % . b) Séjour au réfrigérateur : — en 1 semaine, pas de pertes.
ZIEGLER, 1944 (3).	Lait cru, cru homogénéisé, pasteu- risé, ou pasteurisé homogénéisé en bouteilles de verre blanc (de « 1 quart »).	Exposition à la lumière solaire directe, en milieu de matinée : — en 1 heure, perte de 33 % ; — en 2 heures, perte de 66 % .
STAMBERG et THEOPHI- LUS, 1945 (4).	Lait cru, pasteurisé, ou homogénéisé en bouteilles de verre blanc (de « 1 quart »).	a) Exposition à la lumière solaire directe, au début de la matinée (temp. 16°-19°5 C) : — en 1 heure, pertes de 20 % (l. cru et l. pasteurisé) ou de 13 % (l. homogénéisé) ; — en 2 heures, pertes de 40 % (l. cru), de 35 % (l. pasteurisé) ou de 28 % (l. homogé- néisé). b) Exposition à l'ombre d'un bâtiment (temp. 13°-15°C) : — en 2 heures, pertes très faibles dans les trois laits.
Idem.	Mêmes laits, en bouteilles de verre brun (de « 1 quart »), ou en réci- pients de carton.	Exposition dans les mêmes conditions : — en 5 ou 6 heures, perte très faible.
HOLMES et JONES, 1945 (5).	Lait pasteurisé en bouteilles de verre blanc (de 1/2 pinte).	Exposition à une lumière solaire directe d'intensité variable (2 fois 30 minutes ou 2 fois 60 minutes) : — lorsque la quantité de lumière reçue passe de 5 à 50-70 cal. gm. p. cm ² , la perte croît de 10 à 60-70 % .
JOSEPHSON et collab., 1946 (6).	Lait homogénéisé en bouteilles de verre blanc (de « 1 quart »).	a) Exposition à la lumière solaire directe en fin de matinée (temp. 24°-27°C) : — en 30 minutes, perte de 10 % ; — en 60 minutes, perte de 28 % ; — en 120 minutes, perte de 44 % . b) Exposition à l'ombre d'un bâtiment : — en 30 minutes, pas de perte ; — en 60 minutes, perte de 5 % ; — en 120 minutes, perte de 12 % .
McDOWALL et collab., 1949 (7).	Lait pasteurisé en bouteilles de verre blanc.	Exposition à la lumière solaire au début d'une matinée d'automne faiblement ensoleillée : — en 2 heures, perte de 50 à 60 % .
HERREID et collab., 1952 (8).	Lait pasteurisé homogénéisé en bou- teilles de verre blanc (de 250 ml).	Exposition à la lumière solaire directe, au milieu de la journée : — en 2 heures, perte de 60 à 80 % .

TABLEAU I (suite).

Références	Lait utilisé et conditionnement	Conditions expérimentales et résultats
Idem.	Même lait en bouteilles de verre jaune-rouge ou en récipients de carton.	Exposition dans les mêmes conditions : — en 2 heures, pas de perte.
MIJLL DEKKER et ENGEL, 1952 (1).	Lait stérilisé en bouteilles de verre blanc.	a) Exposition à une lumière diffuse, à la température de la salle : — en 3 mois, perte de 60 % ; — en 6 mois, pas de perte nouvelle. b) Séjour à l'obscurité à la même tempé- rature ou séjour au réfrigérateur : — en 6 mois, pas de perte.
KON et THOMPSON, 1953 (9).	Lait pasteurisé en bouteilles de verre blanc (de 1 pinte).	Exposition à la lumière solaire pendant la matinée (tournée de livraison en camion) : — en 6 ou 7 heures, perte allant de 20 % (février-mai) à 50 % (juin-août).
DAVIDOV et GOULKO, 1954 (10).		Séjour au réfrigérateur : — en 3 jours, perte de 16 %.
FUNAI, 1956 (11).	Lait pasteurisé en bouteilles de verre blanc.	Exposition à la lumière solaire directe en été : — en 1 heure, perte de 74 %, 25 % ou 19 % suivant que le temps est clair, nuageux, ou couvert ; — en 2 heures, perte de 93 %, 46 % ou 30 % dans les mêmes conditions. Pendant les autres saisons, les pertes sont beaucoup plus faibles.

(1) A l'exception de ZIEGLER, qui utilise une méthode microbiologique, tous les auteurs cités dans ce tableau ont dosé la riboflavine par fluorométrie.

Cependant, deux séries de faits montrent l'intérêt pratique de la question :

a) Contrairement au lait pasteurisé, le lait stérilisé n'est généralement pas consommé dans les jours qui suivent le traitement industriel. D'après une enquête sommaire réalisée auprès de professionnels de la région parisienne, la proportion des bouteilles vendues aux consommateurs atteindrait :

- 60 à 80 p. 100, 2 semaines après le traitement (1),
- 90 à 95 p. 100, 1 mois après le traitement.

b) De nombreux expérimentateurs ont signalé l'influence défavorable de certains facteurs physiques — en particulier de l'exposition à la lumière — sur la valeur vitaminique du lait : or, le lait stérilisé peut subir une telle exposition, soit à l'usine même, soit chez le commerçant, soit chez le consommateur.

Mais, les recherches auxquelles nous venons de faire allusion ne sont ici que d'un enseignement assez limité : la plupart d'entre elles ont en effet porté sur des laits crus ou pasteurisés, conservés pendant une courte durée, dans des conditions souvent drastiques. Il est néanmoins utile d'en rappeler les résultats essentiels pour les deux constituants vitaminiques majeurs du lait — riboflavine et vitamine A — sur les-

(1) La vente étant importante dans la deuxième semaine surtout.

quels porte le présent travail, car nous avons tenu compte de ces résultats dans l'établissement du protocole de nos recherches personnelles (tableaux 1 et 2).

Les données du tableau 1 montrent que la teneur en riboflavine du lait cru ou pasteurisé, conditionné en bouteilles de verre blanc, s'abaisse très rapidement sous

TABLEAU 2

*Influence des conditions de conservation du lait
(lumière de température) sur son taux et vitamine A et de carotène.*

Références	Laits utilisés et conditionnement	Conditions expérimentales et résultats
FRANÇOIS, 1948 (12).	Lait en fioles de 500 ml, sous air.	a) Exposition à la lumière solaire, à 20°C : — en 1 semaine, perte de 20 % ; — en 2 semaines, perte de 40 % ; — en 3 semaines, perte de 50 % . b) Séjour à l'obscurité, à la même température : — en 3 semaines, perte de 20 % . c) Séjour au réfrigérateur (2°C) : — en 3 semaines, perte de 30 % .
Idem.	Même lait, en fioles de 500 ml, sous azote.	a) Exposition à la lumière solaire, à 20°C : — en 1 semaine, perte de 30 % ; — en 2 semaines, perte de 45 % ; — en 3 semaines, perte de 50 % . b) Séjour au réfrigérateur (2°C) : — en 3 semaines, perte de 10 % .
MIJLL DEKKER et ENGEL, 1952 (1).	Lait stérilisé en bouteilles de verre blanc.	a) Exposition à une lumière diffuse, à la température de la salle : — en 2 mois, perte de 40 % ; — en 6 mois, pas de perte nouvelle. b) Séjour à l'obscurité, à la même température : — en 3 mois, pas de perte ; — en 6 mois, perte de 20 % . c) Séjour au réfrigérateur : — en 6 mois, perte inférieure à 10 % .
COX et collab., 1957 (13).	Lait cru <i>additionné de palmitate de vit. A</i> (2 000 U. I. par « quart »),	Exposition à la lumière solaire directe : — en 90 minutes, perte de 16 % ;
Idem.	Même lait en bouteilles de verre ambré.	Exposition à la lumière solaire directe : — en 90 minutes, perte de 9 % ; — en 180 minutes, perte de 12 % .
FRANÇOIS et HERMIER, 1957 (14).	Lait stérilisé (à haute température pendant un temps très court) en bouteilles de verre blanc.	Séjour à l'obscurité, à 20-22°C : — après 20 jours, pas de perte ; — après 30 et 45 jours, légère perte.

l'influence de la lumière solaire directe, et plus lentement sous l'influence de la lumière diffuse.

L'effet éventuel de la chaleur ne ressort pas nettement des données du même tableau, les températures élevées se trouvant presque toujours associées à l'action des radiations lumineuses, et les températures plus basses à une protection plus ou moins efficace contre la lumière (séjour à l'ombre ou au réfrigérateur). On peut rap-

peler à ce sujet que, d'après WILLIAMS et CHELDELIN (15), l'ébullition du lait, même prolongée pendant 45 minutes, ne provoque aucune perte de riboflavine si le récipient est couvert, tandis que, dans le cas contraire, la perte peut atteindre 26 p. 100 en 5 minutes, 48 p. 100 en 30 minutes, 64 p. 100 en 45 minutes. Mais il n'en reste pas moins qu'à température élevée, l'action de la lumière paraît plus marquée : exposant du lait à une même source de lumière artificielle pendant 60 minutes, STAMBERG et THEOPHILUS (4) ont observé des pertes de vitamine B₂ de 1,9 p. 100 à 3°C, 5,6 p. 100 à 30°C, 17,8 p. 100 à 60°C et 45,2 p. 100 à 90°C.

Les résultats obtenus par certains auteurs suggèrent d'autre part que la vitesse de la photolyse de la riboflavine dépend du traitement appliqué au lait. STAMBERG et THEOPHILUS (4) signalent que la vitamine résiste mieux après homogénéisation. Et il est frappant que, dans les essais de MIJLL DEKKER et ENGEL (1), la perte de riboflavine du lait stérilisé atteigne seulement 60 p. 100 après 3 mois d'exposition à une lumière diffuse et qu'elle ne s'accroisse plus entre le quatrième et le sixième mois.

Les données du tableau 2 sont peu nombreuses. Mais elles montrent que la teneur en vitamine A du lait exposé à la lumière s'abaisse aussi au cours du temps. D'après FRANÇOIS (12) qui travaille sur du lait frais, il en serait de même du carotène ; en revanche, d'après MIJLL DEKKER et ENGEL (9), le carotène du lait stérilisé serait très stable, même en cas d'exposition prolongée à la lumière, à la température ordinaire.

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Nos recherches portent sur l'évolution, au cours d'une conservation de longue durée — jusqu'à 6 mois — de la teneur en riboflavine, en vitamine A et en caroténoïdes totaux, d'un lait stérilisé, conditionné dans des bouteilles de verre blanc, exposées à la lumière ou protégées contre elle, à des températures diverses.

I. — CARACTÉRISTIQUES DU LAIT UTILISÉ

Le lait employé provenait d'une usine laitière de la région parisienne (1). Les traitements appliqués (graphique 1) étaient les suivants :

a) *Préstérilisation* :

- dans un appareil à ultra haute température 141°C (2) pendant 5 secondes environ ;
- température du lait à la sortie de l'embouteilleuse : 69°C.

b) *Stérilisation en bouteilles* :

- entrée dans le stérilisateur (3) : 66°C ; — sortie du stérilisateur : 55 - 60°C ;
- durée totale du passage dans le stérilisateur : 51 - 52 minutes ;
- température maximum et durée de stérilisation : 15 minutes à 118,5°C.

Le 22 mars 1960, 20 casiers de 10 bouteilles ont été prélevés à l'usine, entre 10 h 30 et 11 h. (1 casier tous les 5 casiers au sortir du stérilisateur) (4).

(1) Nous exprimons nos remerciements à la Société Laitière Métropolitaine, qui nous a procuré le lait nécessaire à notre étude.

(2) Laguilharre, Courbevoie (Seine).

(3) Breil, licence Webster, Paris.

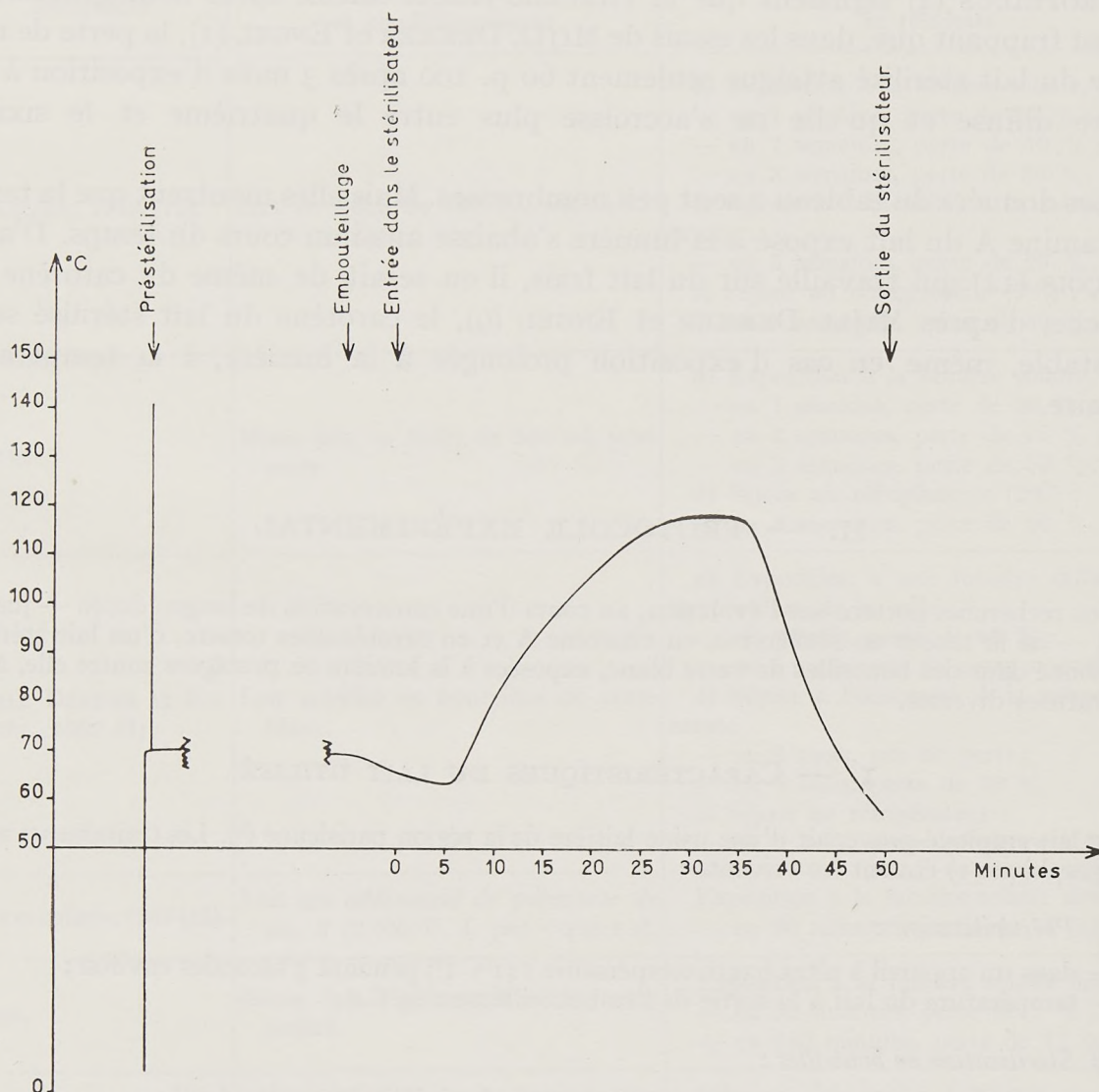
(4) Nous remercions M. GROSCLAUDE qui, à cette époque, faisait partie du personnel de la Station Centrale de Technologie des Produits Animaux, d'avoir bien voulu contrôler les conditions de ces prélèvements.

2. — CONDITIONS DE CONSERVATION

Dix bouteilles — soit une dans un casier sur deux — ont été utilisées pour les analyses immédiates. Les 190 autres ont été réparties en 5 lots de même importance, qui ont été conservés à partir du 23 mars dans des conditions diverses :

- au réfrigérateur ($+ 4^{\circ}\text{C}$), dans l'obscurité ;
- à $+ 20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, dans l'obscurité ;
- à $+ 20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, avec exposition à une lumière diffuse ;
- à $+ 38^{\circ}\text{C} \pm 0^{\circ}5$, dans l'obscurité ;
- à $+ 38^{\circ}\text{C} \pm 0^{\circ}5$, dans des conditions d'éclairement extrêmes : exposition à la lumière solaire directe, avec éclairage artificiel continu.

A $+ 20^{\circ}\text{C}$ comme à $+ 38^{\circ}\text{C}$, les bouteilles placées à l'obscurité se trouvaient dans la même salle que celles exposées à la lumière et à leur voisinage immédiat : elles étaient donc soumises aux mêmes conditions de température.



Graphique 1. — Traitements appliqués au lait utilisé dans les expériences.

Comme local à $+ 20^{\circ}\text{C}$, nous avons utilisé un Laboratoire du C. N. R. Z. (Jouy-en-Josas, S. et O.) exposé au nord ; les bouteilles soumises à l'action de la lumière étaient placées sur une étagère, à 40 cm environ des fenêtres et ne recevaient pas de lumière solaire directe. Le local à $+ 38^{\circ}\text{C}$ était un compartiment de serre du C. N. R. A. (Versailles, S. et O.) avec éclairage artificiel continu fourni par des rampes de 4 tubes Mazdafluor T F 40 watts « lumière du jour », donnant une intensité lumineuse de 3000 lux ⁽¹⁾ ; cet éclairage s'ajoutait donc à l'exposition à la lumière solaire directe.

⁽¹⁾ Nous remercions M. DUJARDIN, Directeur du Centre technique des Fruits et Légumes, de nous avoir aimablement autorisés à utiliser ce compartiment pendant 6 mois consécutifs.

Pour tous les lots, des prélèvements de 7 ou 8 bouteilles, pour analyses, ont été réalisés à la fin de la 2^e, de la 6^e, de la 10^e, de la 15^e, et de la 26^e semaines.

3. — MÉTHODES ANALYTIQUES

Les dosages au « temps zéro » ont porté sur le contenu de chacune des bouteilles prélevées à cet effet (sans aucun mélange) ; ultérieurement, ils ont été réalisés sur plusieurs mélanges obtenus chacun à partir de 2 ou 3 bouteilles.

Prélèvement des prises d'essai.

Le prélèvement des prises d'essai a été réalisé sans difficulté dans les laits maintenus à l'obscurité. Il n'en a pas été de même dans le cas des laits qui avaient subi l'action de la lumière, surtout après plusieurs mois de conservation à + 38°C : dans la plupart des bouteilles, une « boule » de précipité flottait en surface ⁽¹⁾ et une sorte de « gratin » adhérait aux parois. Avant d'effectuer les prises, il a donc été nécessaire, pour homogénéiser le contenu des bouteilles, de l'agiter fortement avec des billes de verre.

Dosage de la riboflavine.

Le dosage de la riboflavine est réalisé par voie microbiologique. L'extraction est effectuée selon la technique générale d'extraction double — acide et enzymatique — préconisée par ADRIAN (16). On suspend un échantillon de lait de 10 à 65 g dans 100 ml environ de ClH 0,1 N et on autoclave 15 minutes. On ajoute ensuite 0,75 g d'acétate de sodium et — après avoir amené le pH à 4,5 —, 2 p. 100 du poids sec de l'échantillon en takadiastase et en papaïne. On laisse incuber une nuit. On ajuste alors à 200 ml, on filtre et on délipide ⁽²⁾ en agitant avec un mélange de deux tiers d'éther diéthylique et un tiers d'éther de pétrole (P. E. 40° - 60°C). On neutralise (pH 6,8) et on filtre à nouveau en cas de besoin (le petit volume de base nécessaire à la neutralisation peut être négligé).

Le dosage est effectué à l'aide de *Lactobacillus Casei* (7469 ATCC), selon la technique classique de SNELL et STRONG (17). Le milieu de base est préparé à partir du « Bacto-Riboflavin-Assay Medium » de Difco, et la croissance des microorganismes est déterminée acidimétriquement après 72 heures d'incubation ⁽³⁾.

Dosage de la vitamine A et des caroténoïdes totaux ⁽⁴⁾

La technique employée s'inspire de celle décrite par KON et THOMPSON (18), qui dérive elle-même de la méthode de OLSON et collab. (19).

La matière grasse est extraite à partir de 100 ml de lait — additionné d'ammoniaque et d'alcool éthylique — par l'éther diéthylique et l'éther de pétrole (P. E. 40° - 60°C).

On saponifie ensuite avec de la potasse alcoolique à 12 p. 100 (15 ml), et on épuise avec de l'éther diéthylique exempt de peroxydes. Après évaporation du solvant, l'insaponifiable est dissous dans 5 à 6 ml de chloroforme.

La vitamine A est dosée colorimétriquement par la réaction de Carr et Price à 618 mμ, avec un spectrophotomètre Jobin et Yvon. Le calcul est fait par référence à une courbe d'étalonnage construite avec une gamme de solutions d'acétate de vitamine A dans le chloroforme, en effectuant la correction nécessitée par la présence de caroténoïdes. Le taux de ces derniers est évalué par mesure de l'intensité de la coloration de l'extrait chloroformique, à 463 mμ, en se référant à une courbe d'étalonnage construite avec une gamme de solutions de β carotène dans le chloroforme.

III. — RÉSULTATS

Le lait utilisé contient initialement, pour 100 g :

- 103 μg de riboflavine,
- 26 μg (= 87 U. I.) de vitamine A,
- 8 μg de caroténoïdes totaux (exprimés en β carotène).

⁽¹⁾ L'une de ces « boules », prélevée sur une bouteille non utilisée pour les dosages de vitamines, pesait environ 3,5 g. Sa teneur en substance sèche était de 51 p. 100.

⁽²⁾ La croissance de la souche employée, *L. Casei* 8, est sous la dépendance des acides gras, qui la stimulent ou l'inhibent. Il est donc recommandé de délipider les extraits.

⁽³⁾ La quantité de riboflavine contenue dans les enzymes employées est négligeable.

⁽⁴⁾ Dans le lait de vache, les caroténoïdes actifs représentent en moyenne 80 p. 100 des caroténoïdes totaux (20).

Sauf pour la vitamine A, ces valeurs sont inférieures aux teneurs vitaminiques généralement admises comme moyennes : mais on se souvient que le lait utilisé est un lait d'hiver.

Les pertes observées au cours de la conservation sont mentionnées dans le tableau 3.

TABLEAU 3

*Pertes de vitamines au cours de la conservation du lait stérilisé
(recherches personnelles).*

Conditions et durée du stockage	Pertes de riboflavine	Pertes de vitamine A	Pertes de caroté- noïdes totaux	Observations	
				Modifications de l'aspect	Modifications du goût
	p. 100	p. 100	p. 100		
<i>Réfrigérateur (+ 4°C)</i>					
2 semaines	néant	néant	néant	—	—
6 semaines	néant	néant	néant	—	—
10 semaines	néant	néant	néant	—	—
15 semaines	néant	néant	néant	—	—
26 semaines	néant	néant	néant	—	—
<i>20°C, Obscurité</i>					
2 semaines	néant	néant	néant	—	—
6 semaines	néant	néant	néant	—	—
10 semaines	néant	néant	néant	—	—
15 semaines	néant	néant	néant	—	—
26 semaines	néant	néant	néant	—	—
<i>20°C, Lumière</i>					
2 semaines	83	45	néant	Brunissement	Légère saveur désa- gréable
6 semaines	90	84	néant	Brunissement	Saveur désagréable
10 semaines	95	88	néant	Brunissement	Lait inconsommable
15 semaines	96	90	néant	Fort brunissement	Lait inconsommable
26 semaines	96	93	néant	Fort brunissement	Lait inconsommable
<i>38°C, Obscurité</i>					
2 semaines	néant	27	néant	—	—
6 semaines	néant	48	néant	—	Légère saveur désa- gréable
10 semaines	néant	43	néant	—	Saveur désagréable
15 semaines	néant	44	néant	Léger brunissement	Lait inconsommable
26 semaines	néant	45	néant	Léger brunissement	Lait inconsommable
<i>+ 8°C, Lumière</i>					
2 semaines	96	36	néant	Fort brunissement	Saveur désagréable
6 semaines	95	84	néant	Fort brunissement	Lait inconsommable
10 semaines	97	91	néant	Fort brunissement	Lait inconsommable
15 semaines	97	87	néant	Fort brunissement	Lait inconsommable
26 semaines	96	93	néant	Fort brunissement	Lait inconsommable

Riboflavine.

Lorsque le lait est maintenu à l'obscurité, la riboflavine est stable, même si la température de stockage est élevée : après six mois de séjour à + 38°C, on retrouve la teneur initiale.

Au contraire, le séjour du lait à la lumière la détruit : après deux semaines d'exposition à une lumière diffuse (à + 20°C), la perte dépasse 80 p. 100, et après le même temps d'exposition à une lumière directe (à + 38°C), elle est quasi-totale.

Vitamine A.

Lorsque le lait est maintenu à l'obscurité, et pourvu que la température ne soit pas trop élevée, la vitamine A est stable ; mais à l'obscurité et à température élevée (+ 38°C), elle disparaît dans une proportion voisine de 25 p. 100 après 2 semaines et de 50 p. 100 après 6 semaines, la perte n'augmentant plus ensuite.

Le séjour à une lumière diffuse (à +20°C) ou à une lumière directe (à +38°C), entraîne des pertes de vitamine A importantes, mais moins rapides que les pertes de riboflavine : elles sont voisines de 40 p. 100 après 2 semaines, dépassent 80 p. 100 après 6 semaines, et continuent ensuite à augmenter lentement.

Caroténoïdes totaux.

Ils sont parfaitement stables, dans toutes les conditions expérimentales réalisées.

IV. — DISCUSSION.

Les résultats obtenus sont bien, dans l'ensemble, ceux que faisaient pressentir les travaux antérieurs cités dans notre introduction : ils confirment notamment qu'il est indispensable de soustraire le lait stérilisé à l'action de la lumière au cours d'un stockage prolongé, si l'on veut qu'il conserve son potentiel vitaminique.

Mais, ces résultats attirent aussi l'attention sur quelques points particuliers :

1° Lorsque le lait est maintenu à l'obscurité, mais à une température élevée (+ 38°C), la vitamine A apparaît moins stable que la riboflavine.

2° Les pertes de riboflavine observées après deux semaines d'exposition à une lumière diffuse sont presque aussi élevées qu'après un temps égal d'exposition à la lumière solaire directe avec éclairage artificiel continu. Cette constatation n'est pas nécessairement en désaccord avec l'existence d'une corrélation entre la quantité de lumière reçue et la proportion de vitamine détruite. Il est en effet probable que, dans nos expériences, la photolyse de la riboflavine a été plus rapide au cours des premières heures (ou des premiers jours), dans le lait soumis au plus fort éclairage ; mais après 2 semaines, les différences sont en grande partie estompées.

3° Contrairement à MIJLL, DEKKER et ENGEL (1), nous n'observons pas de stabilisation des taux de riboflavine et de vitamine A après quelques semaines, dans le lait stérilisé exposé à une lumière diffuse à la température de la pièce : ces taux baissent jusqu'à devenir très faibles.

4° La comparaison de nos résultats avec ceux d'auteurs cités dans l'introduction suggère que la photolyse de la riboflavine est moins rapide dans le lait stérilisé que dans le lait cru ou le lait pasteurisé. Peut-être l'homogénéisation explique-t-elle ce fait en partie : on a vu en effet que, d'après STAMBERG et THEOPHILUS (4), la perte de vitamine B₂ serait moins forte, après exposition à la lumière, dans le lait homogénéisé que dans le lait pasteurisé ordinaire. Il serait évidemment intéressant d'approfondir cet aspect du problème.

V. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nous avons étudié l'évolution, au cours d'une conservation de 6 mois, de la teneur en riboflavine, en vitamine A et en caroténoïdes totaux, du lait stérilisé en bouteilles de verre blanc, conservées :

- au réfrigérateur (+ 4°C), dans l'obscurité ;
- à + 20°C, dans l'obscurité ;
- à + 20°C, avec exposition à une lumière diffuse ;
- à + 38°C, dans l'obscurité ;
- à + 38°C, avec exposition à la lumière solaire directe et éclairage artificiel continu.

Les principales conclusions sont les suivantes :

1° La riboflavine est stable, dans toutes les conditions de température étudiées, pourvu que le lait soit maintenu dans l'obscurité.

Au contraire, le séjour à la lumière la détruit : après 2 semaines d'exposition à une lumière diffuse, à + 20°C, la perte dépasse 80 p. 100.

2° La vitamine A est stable, pourvu que le lait soit maintenu dans l'obscurité et que la température ne soit pas trop élevée ; mais dans l'obscurité et à + 38°C elle disparaît dans une proportion de 25 p. 100 après 2 semaines et de 50 p. 100 après 6 semaines, la perte n'augmentant plus ensuite.

D'autre part, le séjour à une lumière diffuse (à + 20°C) ou à une lumière directe (à + 38°C) entraîne des pertes de vitamine A importantes, mais [moins rapides que les pertes de riboflavine : elles sont voisines de 40 p. 100 après 2 semaines, dépassent 80 p. 100 après 6 semaines, et continuent ensuite à augmenter lentement.

3° Les caroténoïdes totaux sont stables dans toutes les conditions expérimentales réalisées.

4° Ces constatations suggèrent que la principale précaution à prendre, pour assurer le maintien du potentiel vitaminique du lait stérilisé au cours de sa conservation, consiste à le placer à l'abri de la lumière. Mais elles montrent aussi que, pour prévenir toute perte de vitamine A, il est nécessaire d'éviter les températures trop élevées, surtout dans les régions chaudes.

Reçu pour publication en avril 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) MIJLL DEKKER L. P. Van Der et ENGEL C., 1952. The vitamin A, B₁, B₂ and C contents of bottled sterilized milk during storage under various conditions. *Netherl. Milk Dairy J.*, **6**, 104.
- (2) PETERSON W. J., HAIG F. M., SHAW A. O., 1944. Destruction of riboflavin in milk by sunlight. *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 662.
- (3) ZIEGLER J. A., 1944. Photochemical destruction of vitamin B₂ in milk. *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 1039.
- (4) STAMBERG O. E. et THEOPHILUS D. R., 1945. Photolysis of riboflavin in milk. *J. Dairy Sci.*, **28**, 269.
- (5) HOLMES A. D. et JONES C. P., 1945. Effect of sunshine upon the ascorbic acid and riboflavin content of milk. *J. Nutr.*, **29**, 201.
- (6) JOSEPHSON D. V., BURGWARD L. H., STOLTZ R. B., 1946. The effect of route delivery on the flavor, riboflavin and ascorbic acid content of milk. *J. Dairy Sci.*, **29**, 273.
- (7) McDOWALL P. H., McDOWELL A. K. R., CLEMOW N. J., BELL. *Publ. Dairy Res. Inst., N. Z.* no 221. Cités dans KON S. K., HENRY K. M., 1951. Reviews of the progress of dairy science, Section D : Nutritive value of milk and milk products. *J. Dairy Res.*, **18**, 317.
- (8) HERREID E. O., RUSKIN B., CLARK G. L., PARKS T. B., 1952. Ascorbic acid and riboflavin destruction and flavor development in milk exposed to the sun in amber, clear paper and ruby bottles. *J. Dairy Sci.*, **35**, 772.

- (9) KON S. K., THOMPSON S. Y., 1953. The effect of light on riboflavin in milk. *XIII^e Congr. Int. Lait*. La Haye, **2**, 363.
 - (10) DAVIDOV R. B., GOULKO L., 1954. *Inst. Biokhim. Im. A. N. Bahka Sbornik*, **29**, 103. Cité dans KARLIN R., 1960. Les vitamines du groupe B dans le lait de vache. *Ann. Nutr. Alim.*, **14**, 53.
 - (11) FUNAI Y., 1956. Studies on riboflavin in milk. Destruction of riboflavin in milk by sunlight. *Shikoku Acta Med.*, **9**, 38.
 - (12) FRANÇOIS A., 1948. Recherches sur le comportement biochimique et physiologique de la vitamine A dans la sécrétion lactée. Thèse, Paris.
 - (13) COX D. H., COULTER S. T., LUNDBERG W. O., 1957. Effect of nordihydroguaiaretic acid and other factors on stability of added vitamin A in dry and fluid milk. *J. Dairy Sci.*, **40**, 564.
 - (14) FRANÇOIS A. et HERMIER J., 1957. Influence d'un chauffage à haute température pendant un temps très court sur la teneur du lait en vitamines. *IV^e Congr. Int. Nutr.*, Paris.
 - (15) WILLIAMS R. R., CHELDELIN V. H., 1942. Destruction of riboflavin in light. *Science*, **96**, 22.
 - (16) ADRIAN J., 1959. Le dosage microbiologique des vitamines du groupe B. *Cah. Tech. C. N. C. E. R. N. A.*, n° 4.
 - (17) SNELL E. E., STRONG F. M., 1939. A microbiological assay for riboflavin. *Industr. Engng Chem. Anal. Ed.*, **11**, 346.
 - (18) KON S. K., THOMPSON S. Y., 1957. Measurement of vitamins in the control of milk processing. *Milch-wissenschaft*, **12**, 166.
 - (19) OLSON F. R., HEGSTED D. M., PETERSON W. H., 1939. Determination of carotene and vitamin A in milk. *J. Dairy Sci.*, **22**, 63.
 - (20) KON S. K., 1959. Influence du traitement thermique et de la lumière sur la composition et la qualité du lait. *Le Lait*, **39**, 1.
-

PHÉNOMÈNES AMYLOLYTIQUES EN TECHNOLOGIE BOULANGÈRE

II. — APPRÉCIATION PRATIQUE DE L'ACTIVITÉ ALPHA-AMYLASIQUE DES FARINES DE BLÉ

A. BOURDET.

Avec la collaboration technique de Renée BERRIER

*Laboratoire d'Étude et de Contrôle de la Qualité des Blés français,
16 rue Nicolas Fortin, Paris 13^e.*

SOMMAIRE

La technique amylographique demeure une des méthodes la plus couramment utilisée pour chiffrer, en unités conventionnelles, l'activité alpha-amylasique des farines de blé. Après avoir passé en revue les différents travaux concernant l'Amylographe, on montre l'intérêt qu'il y aurait, dans certains cas, à substituer aux conditions expérimentales définies par BRABENDER celles préconisées par les céréalistes américains.

On décrit par ailleurs une autre méthode simple et rapide due à HAGBERG dans laquelle l'activité amylasique est exprimée conventionnellement par le temps de chute d'un solide pénétrant d'une certaine distance dans la suspension empesée.

En fournissant à chacune de ces méthodes une base commune d'expression de l'activité alpha-amylasique, il devient possible, non seulement de préciser leur signification respective du point de vue enzymatique, mais encore de relier sur le plan pratique les données de l'Amylographe à celles de la technique de HAGBERG, et inversement.

INTRODUCTION

Un récent exposé a fourni l'occasion de décrire dans ses grandes lignes le processus de dégradation de l'amidon, et plus particulièrement de préciser le rôle respectif des amylases aux différentes phases de la panification (BOURDET, 1961).

Du point de vue amylolytique, la qualité du pain est la résultante d'un juste équilibre entre les deux types d'activité amylasique.

Dans une certaine mesure, la détermination préalable des activités amylolytiques des farines permet donc de préjuger de leur comportement ultérieur en panification. Cette appréciation se révèle souvent fort utile en ce qui concerne l'activité saccharifiante. Elle devient indispensable dans le cas de l'activité dextrinisante lorsque les conditions de la récolte favorisent la germination des blés.

Nous avons vu que, parmi les nombreuses méthodes d'appréciation de l'activité alpha-amylasique, certaines avaient été plus particulièrement conçues pour les déterminations courantes. La technique de l'Amylographe appartient à cette catégorie.

L'intérêt qu'offre l'Amylographe sur le plan pratique réside principalement dans ses qualités d'appareil automatique et enregistreur. Sa manipulation n'en demeure pas moins assez délicate et son prix relativement élevé limite sa diffusion dans les milieux professionnels.

Il serait donc souhaitable que tout technicien ayant besoin de connaître l'activité alpha-amylasique de ses blés ou de ses farines ait la possibilité de la déterminer à l'aide d'une méthode à la fois simple, rapide et peu coûteuse. Tel a été le but recherché en Allemagne par LEMMERZAHN (1955), en France par GEOFFROY (1956) en diffusant une technique colorimétrique très simplifiée, inspirée du travail original de WOHLGEMUTH (1908). Il n'en reste pas moins que ces techniques fournissent des renseignements essentiellement qualitatifs sans qu'il soit possible de les relier aux données quantitatives de l'Amylographe, lesquelles ne correspondent d'ailleurs qu'à des unités conventionnelles.

La simplicité d'une nouvelle méthode établie par le céréaliste suédois HAGBERG nous a révélé tout l'intérêt que celle-ci pouvait présenter pour les utilisateurs français et nous a incités à l'examiner plus en détails.

L'étude que nous présentons ici poursuivait plusieurs buts :

— Exposer dans leur ensemble les travaux incomplètement ou mal connus dont l'Amylographe a fait jusqu'ici l'objet ;

— Décrire dans ses détails la méthode simple et pratique préconisée par HAGBERG.

— Préciser, sur le plan enzymatique, la signification des données conventionnelles fournies par l'Amylographe et la technique de HAGBERG.

— Permettre, d'un point de vue pratique, l'interprétation réciproque des résultats de l'une ou l'autre de ces méthodes en leur fournissant une base commune d'expression de l'activité alpha-amylasique.

I — ÉTAT ACTUEL DES TRAVAUX CONCERNANT L'AMYLOGRAPHIE

I. — PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

Avant que BRABENDER (1937) ne mette à la disposition des céréalistes son Amylographe, d'autres viscosimètres basés sur un principe analogue avaient été mis au point.

Dès 1932, CAESAR avait construit un consistomètre, amélioré en 1935 par CAESAR et MOORE, permettant de mesurer les variations de la consistance de suspensions d'amidon au cours de l'empesage. L'amylographe réalisé par BRABENDER (1937), et dont BRABENDER MUELLER et KOSTER (1937) devaient décrire en détails la technique expérimentale, présentait un incontestable perfectionnement technique sur les dispositifs antérieurs. Un peu plus tard, BARHAM, WAGONER et REED (1942) construisaient à leur tour un viscosimètre à cylindre tournant.

Viscosimètre de torsion, l'Amylographe permet d'enregistrer en fonction du temps les variations de viscosité d'une suspension aqueuse de farine à mesure que la température s'accroît de manière uniforme, la viscosité étant exprimée en unités conventionnelles comprises entre 0 et 1 000.

Les modifications de cette viscosité sont considérées comme traduisant les transformations subies par l'amidon sous l'influence d'une part de la température, d'autre part des enzymes amylolytiques, plus particulièrement de l'alpha-amylase.

Dans les premiers stades de l'opération, la viscosité de la suspension demeure sensiblement constante. Celle-ci s'accroît au contraire rapidement à partir du moment où débute l'empesage ; à mesure que la température continue à s'élever, l'activité de l'alpha-amylase, portée progressivement à son optimum, exerce sur l'amidon une transformation hydrolytique qui tend à abaisser la viscosité du milieu.

La résultante de ces deux actions opposées se traduit sur la courbe d'évolution de la viscosité par un maximum qui est atteint au moment où intervient la destruction thermique de l'alpha-amylase.

Les transformations subies par l'amidon étant alors irréversibles, la viscosité de l'empois accuse une chute qui se trouve encore accentuée par l'agitation mécanique si celle-ci est prolongée. L'essai est considéré comme terminé dès que la courbe commence à décroître.

2. — INFLUENCE DE DIFFÉRENTS FACTEURS SUR LES DONNÉES AMYLOGRAPHIQUES

Faisant suite aux travaux préliminaires de SCHMIDT et SCHOLZ (1938), de BRABENDER, MUELLER et HEIDE (1938), et de SCHOLZ (1940), deux études critiques ont été publiées simultanément en 1944, l'une par ANKER et GEDDES concernant l'amidon de blé, l'autre par BROWN et HARREL, relative au seigle. Les conclusions auxquelles aboutissent les auteurs sont identiques dans les deux cas : indépendamment de l'action de l'alpha-amylase, de nombreuses variables peuvent modifier la viscosité des suspensions et les courbes amylographiques sont en définitive la résultante d'un grand nombre d'interactions dont la plupart ne sont pas d'origine enzymatique.

Des études ultérieures devaient confirmer ce point de vue et souligner de façon plus précise le rôle de certains facteurs. On peut schématiquement répartir ceux-ci en trois catégories principales selon qu'ils concernent le substrat, c'est-à-dire les farines, et par suite l'amidon qu'elles apportent, le milieu de suspension et les conditions techniques de l'essai.

a) *Le substrat*

Un premier fait, évident en soi, mais que ANKER et GEDDES (1944) ont précisé en travaillant sur des suspensions d'amidon de blé, souligne que la viscosité maximum s'accroît avec la *concentration* en amidon. Dans ces conditions, le sommet de la courbe est davantage accusé et, comme l'avaient déjà observé CAESAR (1932) et BARHAM et coll. (1942), la chute de la viscosité est plus rapide. Ils constatent également que le *vieillissement* de l'amidon ou que le fait de favoriser une libération de maltose se traduisent par un abaissement de la viscosité.

En maintenant égale la concentration en amidon, mais en enrichissant le milieu en gluten, on accroît la viscosité, ce qui amène ANKER et GEDDES à souligner l'importance du *rapport Protéines/Amidon* dans les déterminations amylographiques.

JOHNSON et coll. (1946) constatent à leur tour que toute modification du rapport farine/eau, donc de la concentration en amidon, modifie à la fois la vitesse d'empesage et la viscosité maximum.

Enfin BROWN et HARREL (1944) ont été les premiers à signaler que la *granulation* des farines peut également modifier les données amylographiques.

Ces différentes observations rejoignent l'opinion exprimée par BRIMHALL et HIXON (1942) selon laquelle les résultats de l'Amylographe sont subordonnés à la résistance des granules d'amidon au cisaillement et aux caractéristiques thixotropiques de l'empois.

Ainsi, la teneur des farines en amidon, et par conséquent en protéines, leur granulation, leur degré de vieillissement, leur origine génétique, l'état de l'amidon lui-même, sont autant de facteurs qui peuvent intervenir dans les mesures amylographiques.

b) *Le milieu de suspension*

Examinant l'influence des *sels minéraux*, BROWN et HARREL (1944) ont constaté que les ions calcium et stanneux diminuent la viscosité, que les ions cuivrique, mercurique et cyanhydrique l'augmentent alors que certains sels de sodium, tels que chlorure, sulfate, nitrate et citrate, sont sans influence. De leur côté, DUBOIS et WILLM (1958) ont effectué de nombreux essais méthodiques avec des solutions diluées de sels de sodium, de calcium, de magnésium et de cuivre, sans constater d'influence notable des différents ions examinés sur la viscosité.

En ce qui concerne le *pH de la suspension*, ANKER et GEDDES (1944) ont signalé que la viscosité de suspensions d'amidon de blé diminue de façon linéaire lorsque le pH augmente de 5,2 à 6,8, la diminution observée variant avec la nature du tampon. Les essais sur farines de seigle rapportés par BROWN et HARREL (1944) conduisent à des constatations opposées puisqu'ils trouvent à pH 7 une viscosité 2 fois et demie plus élevée qu'à pH 5,8.

Il est possible que certains constituants tels que les protéines hydrosolubles ou certains mucilages dont le seigle est riche soient en partie responsables de ce comportement.

JOHNSON et coll. (1946) signalent à leur tour qu'en remplaçant l'eau de la suspension par un tampon citrique-phosphate de pH 5,35, les courbes amylographiques obtenues ont la même forme mais différent en hauteur.

En montrant l'influence marquée exercée sur les viscosités amylographiques par différentes eaux minérales ou solutions salines, DUBOIS et WILLM (1958) ont souligné l'importance considérable de la nature de l'eau utilisée et montré que les variations observées étaient en définitive reliées à des modifications de pH du milieu de suspension.

Cette influence exercée par le pH sur les données de l'Amylographe ressort également d'un travail de HAMPL (1959). L'addition d'acide glutamique à des suspensions de farine de blé ou de seigle modifie de façon notable les maxima observés et permet de différencier des farines apparemment semblables. Selon l'auteur, ces modifications auraient pour origine les variations de pH de la suspension qui affecteraient ses propriétés physiques indépendamment de l'activité amylasique.

S'il est donc évident d'admettre, comme l'on montré en particulier MANGELS et MARTIN (1935), que les variations de pH du milieu affectent l'activité amylasique,

il semble qu'elles soient également susceptibles de modifier les propriétés rhéologiques de la suspension empesée.

c) *Technique des essais*

JOHNSON (1954) a signalé à ce sujet que la viscosité maximum d'une même farine déterminée par 20 laboratoires différents variait entre 110 et 610 unités. On a pu constater entre 19 appareils que l'erreur due aux mécanismes enregistreurs était relativement faible (± 20 pour 500 unités). Par contre, des erreurs beaucoup plus importantes avaient pour origine la cinétique de chauffage de la suspension (résistance des fils électriques) et les manipulations des expérimentateurs.

LOSKA et DAY (1956) ont d'autre part attiré l'attention sur l'incidence des conditions de chauffage au cours de l'essai et LOSKA (1957) celles intéressant la vitesse de rotation du bol.

Étudiant l'influence de la température de départ (entre 25 et 65°C) sur les caractéristiques des courbes amylographiques de suspensions d'amidon, ANKER et GEDDES (1944) avaient pu constater un accroissement marqué de la viscosité pour des températures supérieures à 45°C. Avec des farines de seigle, BROWN et HARREL (1944) observent que les viscosités ne sont pas modifiées tant que la température reste inférieure 40°C et proposent de raccourcir l'opération en fixant le départ de l'essai à 40°C au lieu de 25°C. MARNET et coll. (1948) manifestent des préoccupations analogues en proposant, pour les farines de blé, une méthode de détermination accélérée utilisant une température de départ de 45°C et une élévation de température de 3,5 à 4°C par minute, ce qui ramène à 12 minutes la durée totale de l'opération.

Afin de pouvoir, dans la mesure du possible, contrôler certaines des variables qui viennent d'être examinées et limiter les divergences expérimentales, une standardisation de la méthode apparaissait donc indispensable.

C'est avec ce souci que la technique décrite par SELMAN et SUMNER (1947) fut retenue par les céréalistes américains et adoptée comme méthode officielle de l'A. A. C. C.

Dans cette méthode, l'eau distillée est remplacée par une solution tampon de pH 5,35 et la concentration en farine d'environ 18 p. 100 préconisée par BRABENDER (80 g farine/450 ml d'eau distillée) est portée à environ 22 p. 100 (100 g farine/460 ml de solution tampon). En outre, la température de départ est fixée à 30°C au lieu de 25°C.

Jusqu'à présent, les conditions d'utilisation de l'Amylographe en France ont été en principe celles décrites par BRABENDER, mais nombreux sont les expérimentateurs qui n'en ont pas toujours tenu compte de façon rigoureuse, particulièrement en ce qui concerne la nature de l'eau utilisée.

II — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Nous avons utilisé pour nos essais différentes farines industrielles destinées à la panification, soit telles quelles, soit en mélange à des taux divers avec des farines maltées du commerce ou des farines préparées au laboratoire à partir de blés germés.

Les proportions respectives des différentes farines en mélange ont été choisies de façon à réaliser une gamme d'activité amylasique suffisamment étendue.

1. — *Méthodes analytiques utilisées.*

Sur les différents échantillons ainsi obtenus, trois techniques dont deux essentiellement pratiques (Amylographe et méthode de HAGBERG) ont été appliquées simultanément.

La troisième, qui a constitué dans cette étude la *méthode de référence*, apprécie l'action dextrinante de l'alpha-amylase par l'intermédiaire de la coloration à l'iode. Elle a été décrite par SANDS-TEDT et coll. (1939) et permet d'exprimer l'activité d'une farine en unités alpha-amylase correspondant au nombre de grammes d'amidon dextrinisés en 1 heure et à 30°C par 1 g. de l'échantillon étudié.

Les *essais amylographiques* ont été effectués selon 2 modes expérimentaux différents : l'un correspondant aux conditions définies par BRABENDER : farine 80 g. — eau distillée 450 ml, température de départ 25°C, le second reproduisant celles de la méthode officielle de l'American Association of Cereal Chemists (AACC) soit : farine 100 g. solution tampon pH 5,35 460 ml, température de départ 30°C. Une description détaillée de cette méthode est donnée dans Cereal Laboratory Methods, p. 36, 6^{ème} édition 1957.

Quant à la méthode HAGBERG dont, à notre connaissance, aucune publication française n'a fait encore état, nous en donnons ci-dessous la description détaillée.

2. — *Méthode de Hagberg de détermination du temps de chute 6/25/45 sec.*a) *Principe.*

La consistance d'une suspension de farine empesée et soumise à l'action de ses amylases est appréciée par l'intermédiaire du temps mis par une charge constante pénétrant dans l'empois à parcourir une distance donnée.

Plus ce temps sera court, plus la consistance de l'empois sera faible et plus grande sera l'activité amylasique. Inversement celle-ci sera d'autant plus faible que le temps de pénétration sera plus long.

La détermination, qui est simple et rapide, s'effectue dans un tube à essai et au bain-marie bouillant, ce qui supprime l'emploi d'un thermostat.

Le pénétromètre permettant d'apprécier la consistance joue en même temps le rôle d'agitateur.

L'élévation progressive de la température au sein de la suspension détermine d'abord la formation de l'empois et permet ensuite aux amylases d'atteindre leur maximum d'activité avant d'être détruites par la chaleur.

b) *Matériel nécessaire.*

La figure 1 ci-contre en donne le schéma :

— Bain-marie en aluminium d'environ 20 cm de haut et 15 cm de diamètre chauffé électriquement (réchaud de 600 W. 220 volts).

— Couvercle du bain-marie faisant office de support de tube muni :

— à sa partie supérieure d'un orifice formé d'une bague d'aluminium (a) (hauteur 50 mm, diamètre intérieur 24 mm) permettant le passage et le maintien du tube de verre, d'une pièce métallique mobile (m) assurant sa fixation et d'un trou (t) (diamètre 1,5 mm) permettant à la vapeur de s'échapper.

— à sa partie inférieure d'une couronne d'aluminium à laquelle sont fixées 4 griffes (g) recevant le fond du tube de verre.

— Tubes à essais en verre Pyrex — longueur 220 ± 1 mm — diamètre intérieur $21 \pm 0,02$ mm, diamètre extérieur $23,7 \pm 0,05$ mm.

Bouchons de caoutchouc correspondants.

— *Pénétromètre* : Il est constitué d'une tige métallique (longueur 320 mm, diamètre 3 mm) équipée à sa partie inférieure d'une petite roue (r) (diamètre $20 \pm 0,05$ mm) à 3 rayons, ce qui lui donne l'aspect d'un bâton de ski miniature.

Sur cette tige sont fixées 2 bagues-butées, b₁ et b₂, limitant la course du pénétromètre, entre lesquelles est emprisonné un bouchon d'ébonite pouvant être adapté sur le tube de verre. Les 2 butées (diamètre 12 mm, épaisseur 4 mm) sont distantes l'une de l'autre de 103 mm, la distance de la surface inférieure de la roue à la surface supérieure de la butée du bas étant elle-même de 115 mm.

Le poids du pénétromètre (bouchon d'ébonite non compris) est d'exactement 25 g.

c) *Mode opératoire.*

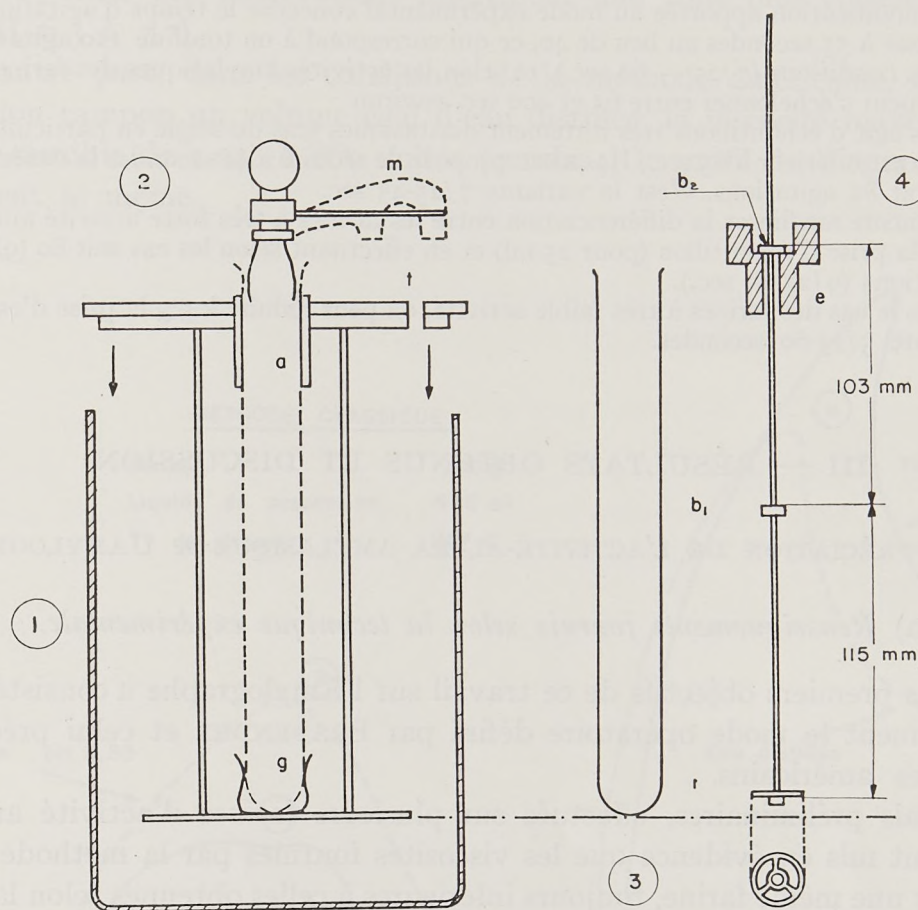
— Remplir le bain-marie d'eau jusqu'à 2,5 cm environ du bord supérieur et le porter à ébullition.

— Peser 6 g de la farine à étudier dans un tube à essai et ajouter 25 ml d'eau distillée. Obturer le tube par un bouchon de caoutchouc et rendre la suspension homogène par 20 agitations successives et vigoureuses à la main.

— Remplacer le bouchon caoutchouc par l'agitateur pénétromètre et plonger aussitôt le tube dans le bain-marie bouillant. Déclencher le chronomètre au moment même où la partie inférieure du tube touche le fond du support. Rabattre sur le bouchon d'ébonite la pièce métallique assurant la fixation du tube.

— Après exactement 5 secondes, appliquer à l'agitateur, à raison de 2 agitations par seconde, un mouvement alternativement ascendant et descendant, chaque aller et retour correspondant à une agitation. Agiter ainsi, en maintenant la même cadence, pendant 40 secondes, soit un total de 80 agitations. Il est indispensable, pour la reproductibilité des résultats de respecter ces conditions.

— Exactement 45 secondes après la mise en marche du chronomètre, l'agitateur-pénétrromètre étant à sa position supérieure (bague inférieure au contact du bouchon d'ébonite) le laisser retomber par son propre poids dans la suspension empesée.



DISPOSITIF DE HAGBERG POUR
DETERMINATION DU TEMPS DE CHUTE

FIG. 1

Arrêter le chronomètre lorsque la surface inférieure de la bague du haut arrive au niveau de la partie supérieure du bouchon d'ébonite ; la distance parcourue dans ces conditions par le pénétrromètre au sein de l'empois est de 64 mm.

Le temps de chute, qui mesure l'activité dextrinisante-liquéfiante, est exprimé par le temps total, en secondes, compté à partir du déclenchement du chronomètre.

Dans cette étude, nous avons adopté la notation initialement proposée par l'auteur, qui ne tenait pas compte des 45 premières secondes nécessaires à la pose du tube et à l'agitation.

Les valeurs qui seront rapportées plus loin expriment donc les temps de chute réels. Il suffit de les augmenter de 45 secondes pour obtenir le temps de chute total définitivement retenu par HAGBERG.

Dans les conditions qui viennent d'être décrites, le temps de chute réel peut varier d'environ 300 secondes pour les produits peu diastasiques à quelques secondes seulement pour ceux dont l'activité dextrinisante est élevée.

d) Variantes de la méthode.

La méthode précédente couvre une gamme d'activités amylasiques suffisamment étendue pour qu'elle puisse être appliquée à la plupart des farines utilisées en panification française, qu'elles proviennent de blés sains ou partiellement germés.

Lorsque les activités sont élevées (cas des céréales germées) HAGBERG propose d'augmenter la concentration en farine de la suspension. L'accroissement relatif de la consistance qui en résulte accentue ainsi les différences entre les échantillons.

Dans un même volume d'eau distillée (25 ml) on peut, par exemple, porter le poids de farine à 7 g. La seule modification apportée au mode expérimental concerne le temps d'agitation de la suspension qui passe à 55 secondes au lieu de 40, ce qui correspond à un total de 110 agitations au lieu de 80. Dans ces conditions (7/25 — 60 sec.), et selon les activités amylasiques des farines, le temps de chute total peut s'échelonner entre 65 et 400 sec. environ.

Lorsqu'il s'agit d'échantillons très fortement diastasiques (cas du seigle en particulier) et que le temps de chute est inférieur à 65 sec., HAGBERG propose de réduire à 40 secondes la durée d'agitation de l'empois, soit 80 agitations. C'est la variante 7/25-45 sec.

On peut encore améliorer la différenciation entre les farines à très forte activité amylasique en portant à 9 g. la prise d'échantillon (pour 25 ml) et en effectuant selon les cas soit 80 (9/25-45 sec.), soit 110 agitations (9/25-60 sec.).

Enfin dans le cas des farines à très faible activité, on peut réduire à 5 g la prise d'essai et pratiquer la variante 5/25-60 secondes.

III — RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

I. — APPRÉCIATION DE L'ACTIVITÉ-ALPHA AMYLASIQUE A L'AMYLOGRAPHE

a) Renseignements fournis selon la technique expérimentale.

L'un des premiers objectifs de ce travail sur l'Amylographe a consisté à étudier comparativement le mode opératoire défini par BRABENDER et celui préconisé par les céréalistes américains.

Des essais préliminaires, effectués sur plusieurs farines d'activité amylasique différente, ont mis en évidence que les viscosités fournies par la méthode classique étaient, pour une même farine, toujours inférieures à celles obtenues selon la méthode de l'AACC.

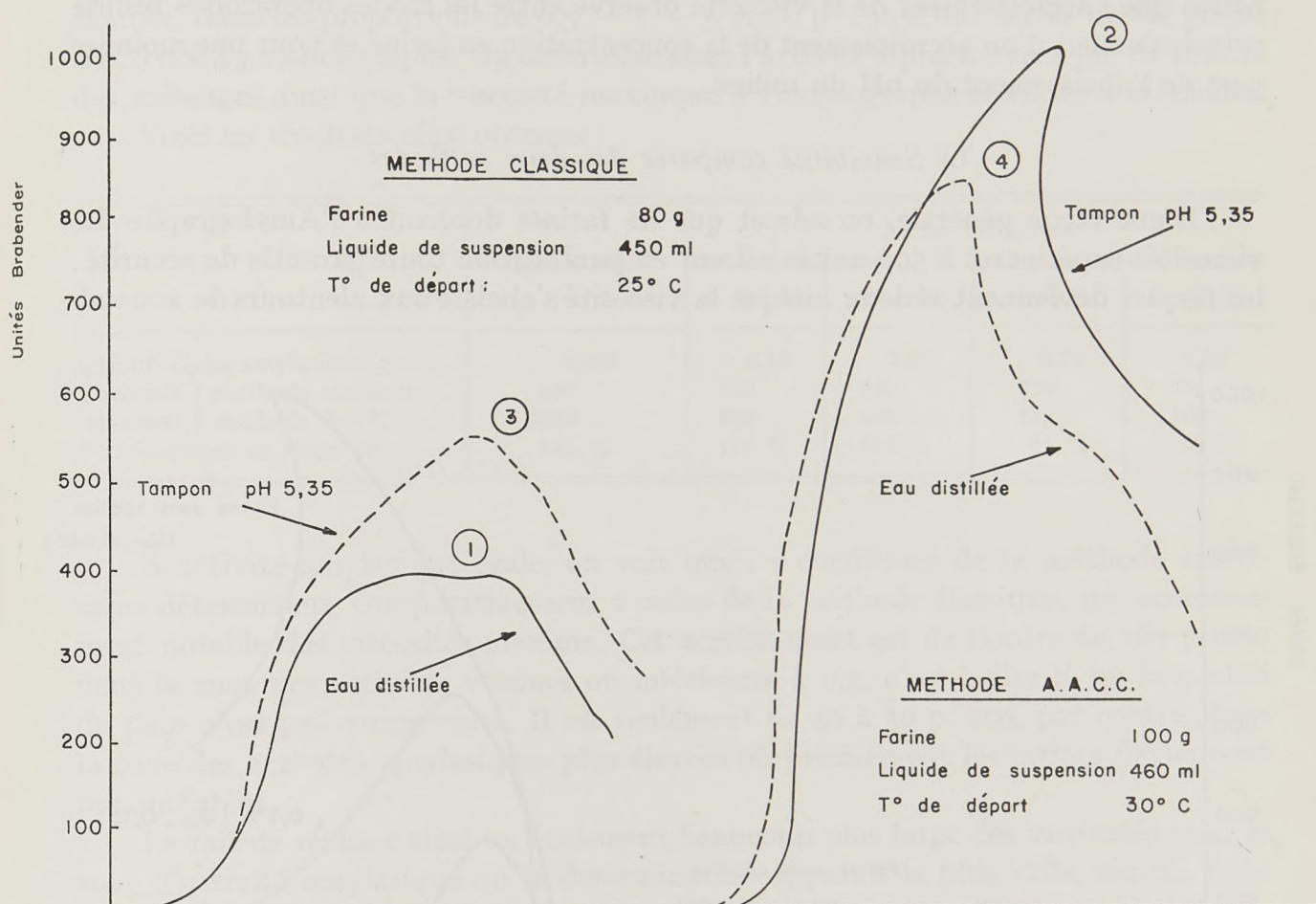
Ces 2 techniques se différenciant à la fois par la concentration en farine utilisée et par la nature du liquide de suspension, nous avons cherché à préciser l'influence respective de ces deux facteurs.

Les graphiques en traits pleins de la figure 2 (courbes 1 et 2) illustrent l'allure des amylogrammes obtenus par l'une et l'autre méthode à partir d'une même farine. Il s'agit d'une farine commerciale dont la viscosité maximum de 400 (méthode classique, courbe 1) correspond à une activité amylasique (0,065 unités alpha-amylase) satisfaisante pour les besoins de la panification. La viscosité maximum passe à 1 020 unités en utilisant la méthode américaine (courbe 2). Indépendamment de l'accroissement observé, l'allure de la courbe est modifiée et le maximum très étalé dans le premier cas fait place à un pic nettement prononcé ; la chute de la viscosité est elle-même plus rapide. On rejoint là les constatations de même nature signalées par ANKER et GEDDES (1944) lorsque la concentration en amidon est accrue.

En respectant les concentrations respectives en farine, mais en modifiant la nature du milieu de suspension, on obtient les diagrammes en pointillé (courbes 3 et 4) qui illustrent les modifications ainsi apportées à la viscosité maximum.

Lorsqu'on substitue à l'eau distillée de la méthode classique un même volume de solution tampon pH 5,35, la viscosité passe de 400 à 550 unités et le sommet de la courbe devient plus marqué (courbe 3). La suspension de farine dans l'eau distillée ayant un pH voisin de 6-6,2, cet accroissement de la viscosité, parallèlement à un abaissement du pH du milieu, est également en bon accord avec les observations de ANKER et GEDDES (1944). Il ne vérifie pas par contre celles de DUBOIS et WILLM (1958) selon lesquelles un accroissement du pH s'accompagne d'une élévation de la viscosité ; mais ces observations intéressent une zone plus voisine de la neutralité (pH 6,3 à 7,7).

Si d'autre part, dans les conditions de la méthode américaine, on substitue à la solution tampon un volume égal d'eau distillée, la viscosité maximum accuse une chute sensible de 1 020 à 860 unités (courbe 4) le profil du diagramme restant sensiblement le même.



Influence de la concentration en farine :

Une simple comparaison entre les courbes 1 et 4 montre que le seul fait d'élever la concentration en farine de 17,8 p. 100 (méthode classique) à 21,7 p. 100 (méthode AACC) se traduit par une augmentation de viscosité de 400 à 860 unités lorsqu'on opère en présence d'eau distillée.

De même, l'examen des courbes 3 et 2 fait apparaître que le même accroissement de la concentration en farine fait passer la viscosité de 550 à 1 020 lorsque la suspension est tamponnée.

Dans les deux cas, la viscosité est sensiblement doublée, ce qui confirme à nouveau les observations antérieures de ANKER et GEDDES (1944).

Influence de la solution tampon :

On peut, de la même façon, apprécier l'influence exercée par la solution tampon aux deux concentrations en farine utilisées. Dans les conditions de la méthode classique, l'emploi du tampon accroît la viscosité d'environ 37 p. 100 (de 400 à 550 unités) ; avec l'autre méthode, cet accroissement est de l'ordre de 18 p. 100 seulement (de 860 à 1 020 unités).

Nous signalerons que les résultats ne paraissent influencés de façon significative ni par la température de départ, ni par la préparation initiale de la suspension qui diffèrent d'une méthode à l'autre. On peut donc retenir de ces observations préliminaires que l'accroissement de la viscosité observé entre les modes opératoires résulte principalement d'un accroissement de la concentration en farine et pour une moindre part de l'abaissement du pH du milieu.

b) Sensibilité comparée des deux méthodes

D'une façon générale, on admet que les farines donnant à l'Amylographe des viscosités supérieures à 500 unités offrent en panification toute garantie de sécurité ; les risques deviennent sérieux lorsque la viscosité s'abaisse aux alentours de 200 uni-

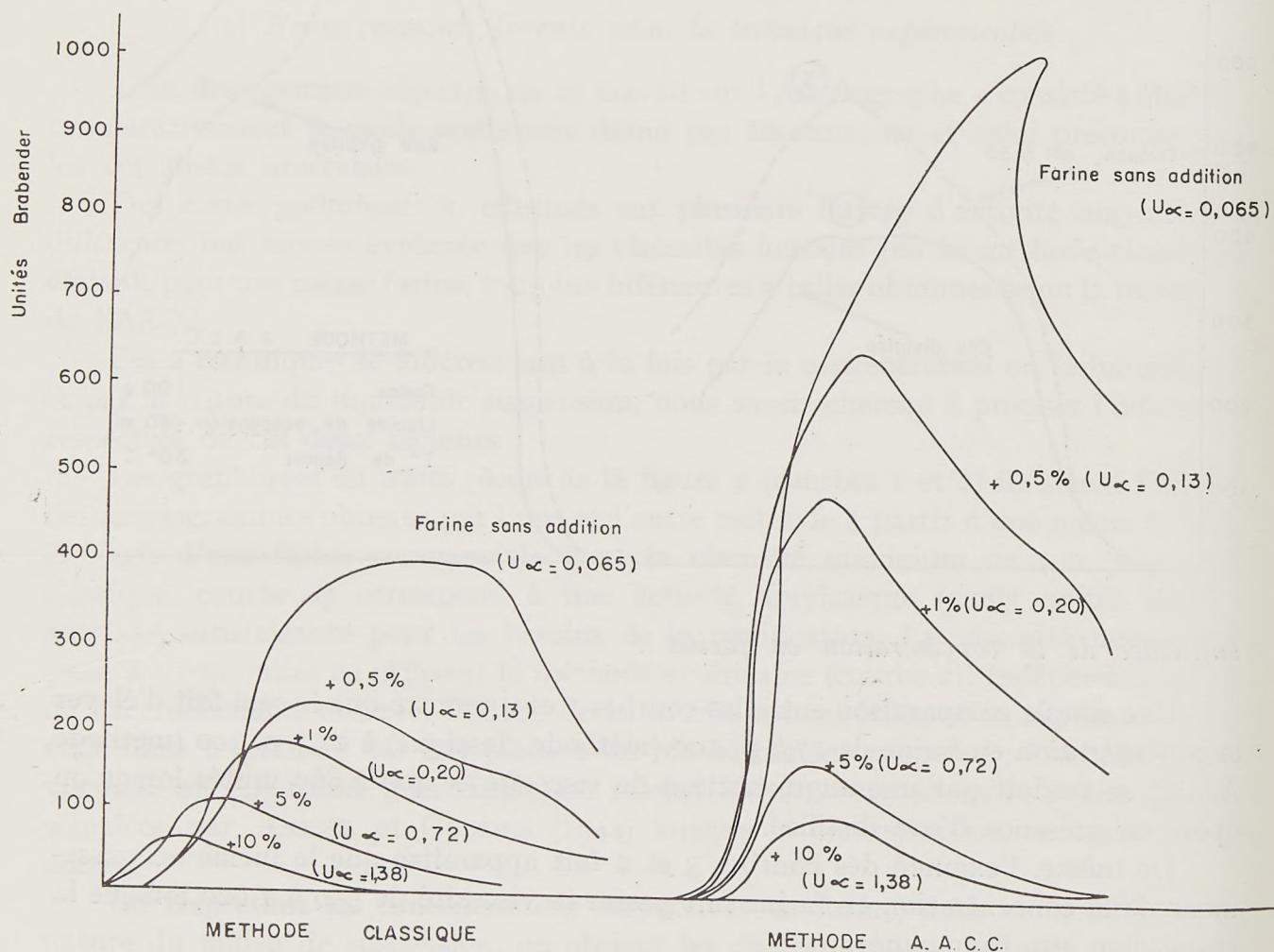


FIG. 3

tés ; ils sont certains quand les amylogrammes deviennent inférieurs à cette valeur et les mesures ne sont plus guère significatives lorsque les viscosités se situent au-dessous de 120 unités.

En d'autres termes, quand on adopte le mode opératoire classique, la zone pratique d'utilisation de l'appareil se trouve limitée aux viscosités comprises entre environ 500 et 100 unités. De ce point de vue, et particulièrement lorsqu'il s'agit d'apprécier l'endommagement par germination, l'Amylographe est donc un appareil incomplètement utilisé sur le plan des besoins de la panification française.

Il ne semble plus en être de même quand on adopte les conditions expérimentales en usage aux USA puisque, pour une même activité amylasique, la viscosité maximum est accrue, et que, du même fait, on améliore la sensibilité de la détermination, ainsi qu'en témoignent les faits expérimentaux suivants, illustrés par la fig. 3.

Une farine panifiable, d'activité alpha-amylasique de 0,065 unités, est additionnée, dans les proportions de 0,5 — 1 — 5 et 10 p. 100 d'une farine de blé germé d'activité 13,2 unités alpha. On détermine alors l'activité alpha amylasique de chacun des mélanges ainsi que la viscosité maximum à l'amylographe selon les 2 méthodes.

Voici les résultats ainsi obtenus :

	Farine seule	Farine blé germé			
		+ 0,5 %	+ 1 %	+ 5 %	+ 10 %
activité alpha amylasique	0,065	0,13	0,20	0,72	1,38
Viscosités { méthode classique . . .	400	240	180	120	65
maxima { méthode AACC	1020	650	480	170	100
Accroissement en viscosité	155 %	170 %	166 %	41 %	53 %

A activité amylasique égale, on voit que les conditions de la méthode américaine déterminent, comparativement à celles de la méthode classique, un accroissement notable des viscosités maxima. Cet accroissement est de l'ordre de 160 p. 100 dans la zone des activités voisines ou inférieures à 0,2, c'est-à-dire là où la qualité du pain n'est pas compromise. Il est seulement de 40 à 50 p. 100, par contre, dans la zone des activités amylasiques plus élevées où précisément les farines deviennent impanifiables.

Le fait de réaliser ainsi un étalement beaucoup plus large des viscosités pour la zone d'activité amylasique où la détermination apparaît la plus utile, semble donc conférer un intérêt tout particulier à la méthode utilisant un pH plus acide.

Bien que moins importante, l'amélioration de la sensibilité que déterminent ces conditions opératoires reste encore très acceptable dans la zone des activités amylasiques où les risques d'une dextrinisation trop poussée deviennent les plus grands. On peut noter en effet, en ce qui concerne les mélanges dont l'activité est respectivement de 0,20 et 0,72 unités alpha, que la différence entre les viscosités mesurées selon la méthode classique est seulement de 180 — 120 = 60 unités BRABENDER. Avec la méthode en milieu tamponné, les viscosités sont respectivement de 480 et 170, soit une différence de 310 unités. Il est évident que l'appréciation amylographique du pouvoir dextrinisant des farines sera dans ces conditions à la fois plus précise et plus significative.

Puisque, quel que soit le mode opératoire utilisé, les valeurs de viscosités déterminées demeurent conventionnelles et que seule compte en définitive l'activité enzymatique des farines testées, on peut fort bien envisager d'adopter l'une ou l'autre des techniques amylographiques selon le degré d'activité amylasique des farines, pourvu que l'on choisisse les conditions offrant la meilleure sensibilité.

C'est ainsi que, dans le cas des farines insuffisamment diastasiques, l'emploi de l'Amylographe dans les conditions classiques conviendrait parfaitement, puisque les viscosités significatives s'inscrivent approximativement dans la moitié supérieure du graphique.

Lorsqu'au contraire l'activité amylasique des farines est telle que les viscosités intéressent la moitié inférieure de ce graphique, il y aurait lieu de recourir à l'autre mode opératoire.

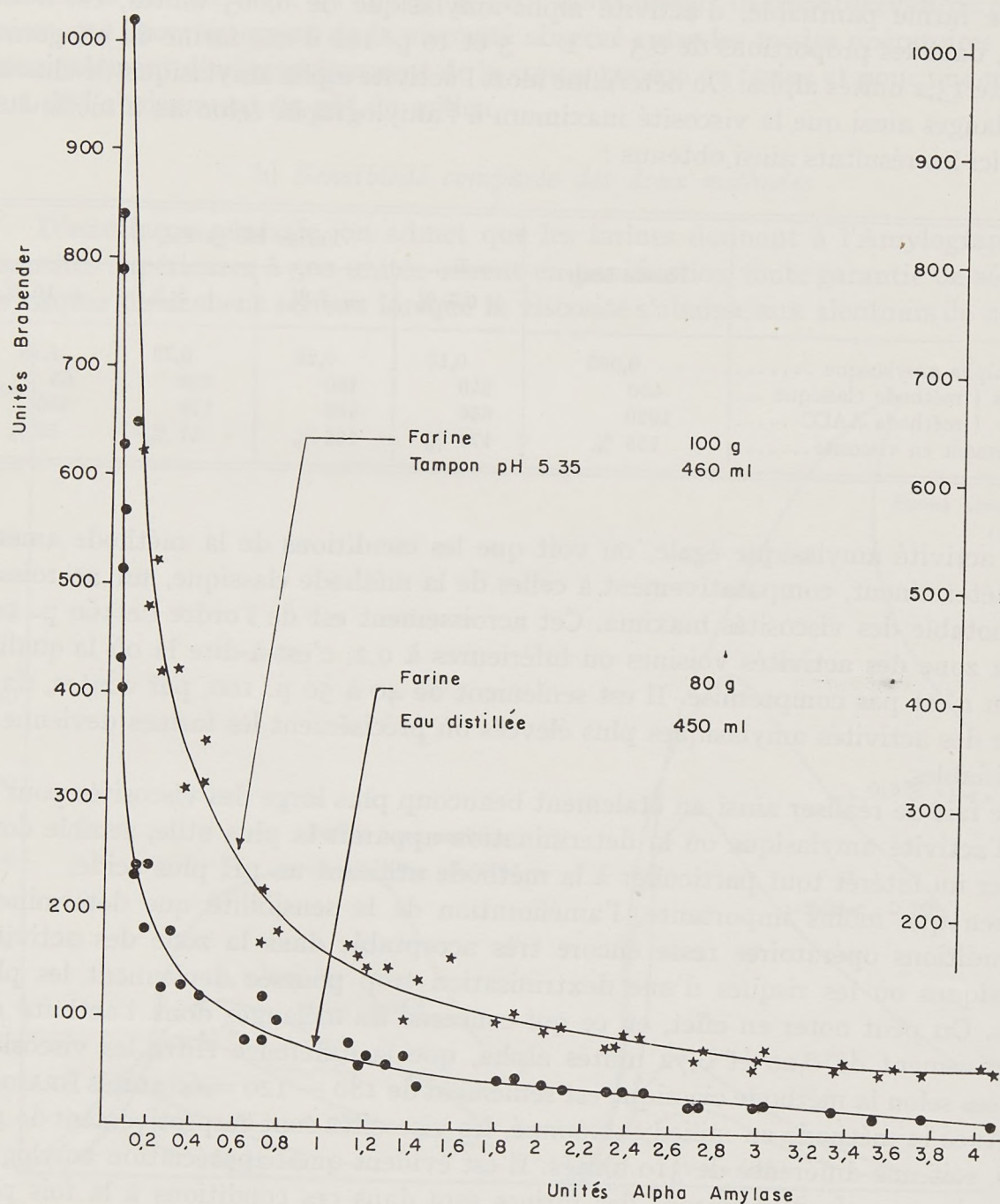


FIG. 4

c) Relations entre les données amylographiques et l'activité alpha-amylasique

Puisque, selon les conditions de l'expérience, des viscosités de valeur différente correspondent à un même degré d'activité amylasique, il apparaît utile d'établir une relation entre ces unités conventionnelles en les rapportant à une valeur de base exprimant de façon aussi spécifique que possible l'activité alpha-amylasique elle-même.

C'est cette relation qu'expriment les graphiques de la fig. 4 où les viscosités maxima déterminées à l'Amylographe par chacune des deux méthodes précédentes ont été portées en fonction des activités amylasiques des farines étudiées.

Bien que la méthode de référence utilisée dans nos essais diffère dans son principe de celle pratiquée par COUPEROT et BERGAULT (1958), les courbes obtenues présentent la même allure générale, indiquant que la viscosité est d'autant plus faible que l'activité amylasique est elle-même plus élevée. Mais les courbes n'étant pas superposables, selon que l'on utilise la méthode classique ou l'autre, la relation est fonction du mode expérimental adopté.

En ce qui concerne la détermination amylographique selon les indications de BRABENDER, on constatera qu'à une variation importante des viscosités maxima, dans la zone comprise entre 1 000 et 250 unités environ, correspond une variation extrêmement faible des activités alpha, celles-ci restant inférieures à 0,1. A l'inverse, dans la région des très faibles viscosités, une très forte variation de l'activité amylasique (de 1,2 à plus de 4) modifie très peu la viscosité maximum.

La zone où la sensibilité de l'amylographe est la plus marquée intéresse donc des activités comprises entre environ 0,1 et 1,2 unités alpha, ce qui correspond sensiblement à une variation des viscosités allant de 300 à 60 unités.

Les mêmes remarques s'appliquent lorsque les déterminations sont faites selon la méthode américaine. Mais, dans ce cas, la sensibilité la plus grande intéresse les activités comprises entre environ 0,12 et 1,8 et des viscosités allant de 700 à 100 unités.

2 — APPRÉCIATION DE L'ACTIVITÉ AMYLASIQUE SELON HAGBERG

Parallèlement aux déterminations précédentes, la méthode du pénétromètre de HAGBERG, dont nous avons donné plus haut la description détaillée, a été appliquée à la même série de farines constituant une gamme étendue d'activités alpha-amylasiques.

Les temps de chute, déterminés dans les conditions 6/25-45 secondes, s'échelonnent entre quelques secondes pour les activités les plus élevées et environ 300 secondes pour les activités les plus faibles.

Nous avons cherché à préciser la relation de ces unités conventionnelles avec l'activité dextrinisante. La courbe de la fig. 5 illustre les résultats ainsi obtenus.

L'allure générale de cette courbe présente une grande similitude avec celles obtenues à partir des viscosités amylographiques. Dans la zone des faibles activités, à une très faible variation de l'activité alpha-amylase correspond une variation importante du temps de chute. A l'opposé, pour les fortes activités, un accroissement notable du pouvoir de dextrinisation se traduit par une diminution limitée de la durée de pénétration.

Jusqu'à environ 0,1 unités alpha-amylase, équivalant à un temps de pénétration voisin de 180 secondes, la courbe accuse une chute brutale ; son évolution devient ensuite progressive et régulière jusqu'aux activités voisines de 2,5 unités alpha-amylase, l'abaissement du temps de chute au-delà de cette valeur devenant alors très faible.

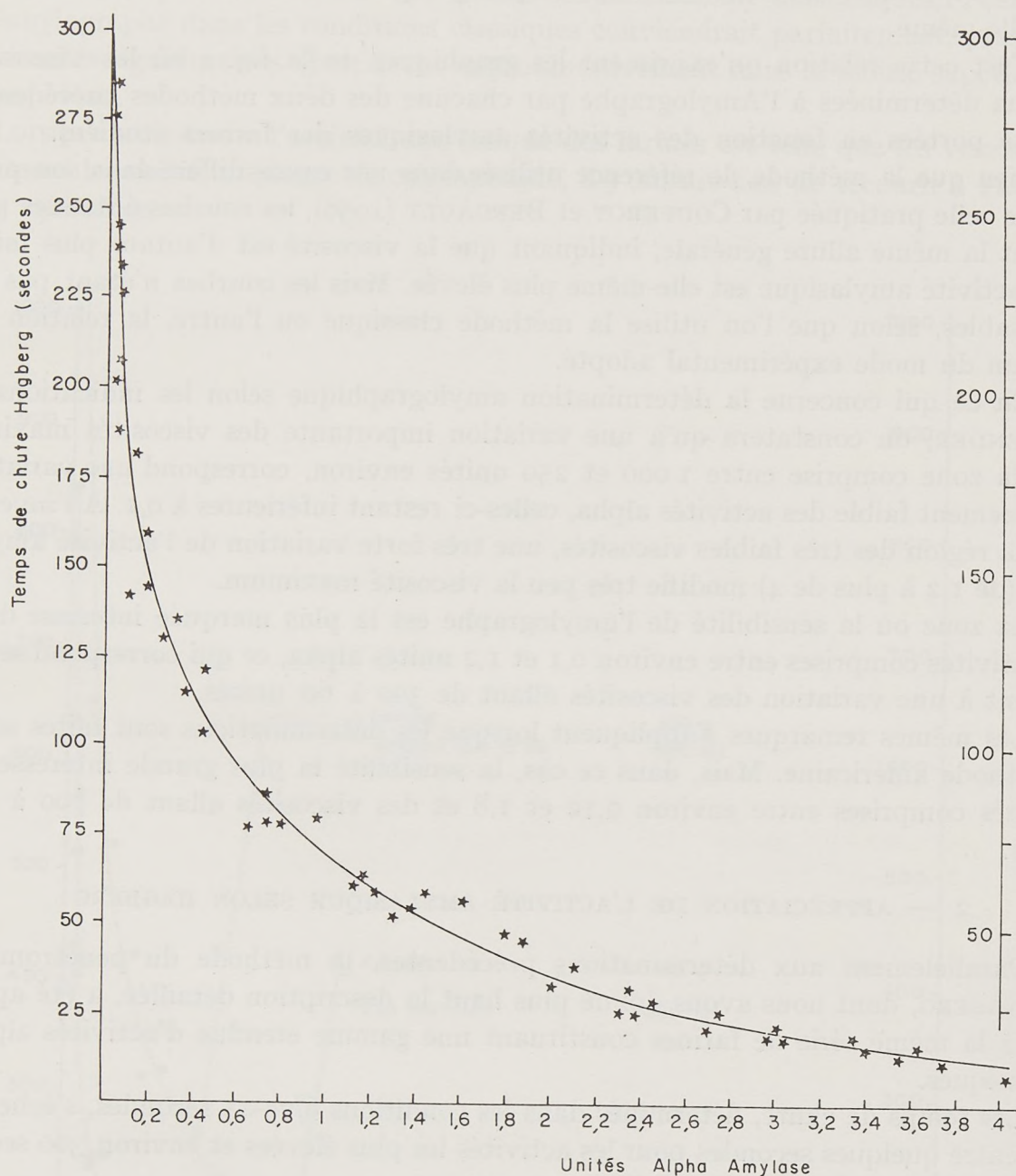


FIG. 5

La relation unissant l'activité amylasique des farines et l'indice de pénétration défini par HAGBERG est donc du même type que celle concernant cette même activité et les viscosités amylographiques. Cette similitude n'est cependant que partielle, car un examen attentif révèle qu'aux activités élevées la tendance de la courbe à devenir parallèle à l'axe des abscisses est plus accusée dans le cas des déterminations à l'Amylographe ; mais cette différence est surtout marquée lorsque les conditions expérimentales sont celles de la méthode classique et la courbe obtenue, en adoptant le mode opératoire de l'AACC est en définitive très voisine de celle relative aux déterminations selon HAGBERG.

En admettant, comme nous l'avons fait précédemment, que les limites supérieure et inférieure d'activité dextrinisante des farines permettant une panification normale sont respectivement de 0,05 et 0,5 unités alpha-amylase, on constatera qu'elles correspondent à des temps de chute allant approximativement de 220-230 secondes à 90-100 secondes.

Au-dessous de cette dernière limite, l'évolution du temps de chute en fonction de l'activité demeure encore suffisamment lente pour qu'il soit possible d'estimer avec assez de précision l'activité des farines hyperdiastasiques, ce que permet beaucoup moins aisément, nous l'avons vu, la méthode amylographique classique.

3 — EXPRESSION COMPARÉE DE L'ACTIVITÉ SELON LES DEUX MÉTHODES

Établies à des fins pratiques, les méthodes de BRABENDER et de HAGBERG utilisent l'une et l'autre un mode expérimental visant à reproduire les conditions de la panification. En soumettant une suspension de farine à un chauffage progressif, lent dans le premier cas, plus rapide dans le second, elles permettent à l'alpha-amylase d'exercer son action dextrinisante dans des conditions assez comparables à celles qu'offre la pâte boulangère après la mise au four.

Expression comparée de l'activité alpha-amylasique des farines de blé selon la méthode expérimentale

DEXTRINISATION (Sandstedt & Coll.)	AMYLOGRAPHE		HAGBERG Temps de chute réel 6 g/25 ml (*)
	80 g/450 ml eau distillée	100 g/460 ml tampon pH 5,35	
(unités α amyl.)	(U. B.)	(U. B.)	(secondes)
0,030	850	> 1 000	285
0,035	790	—	241
0,060	630	—	235
0,080	570	—	226
0,050	515	—	202
0,065	400	1 020	207
0,13	240	650	183
0,14	230	620	170
0,20	180	480	162
0,27	130	420	130
0,36	130	310	116
0,43	120	320	104
0,72	80	220	78
0,79	100	180	78
1,18	60	160	64
1,22	70	150	59
1,44	40	140	58
1,88	50	110	45
2,10	40	100	39
2,46	40	90	28
2,75	30	80	26
3,00	30	70	23
3,62	20	70	18
4,20	20	60	13
5,90	20	40	6

* Ajouter 45 secondes pour obtenir le temps de chute total.

Il n'en reste pas moins que l'appréciation du degré de dextrinisation fait appel à des principes différents, puisqu'il s'agit avec l'Amylographe de mesurer une vis-

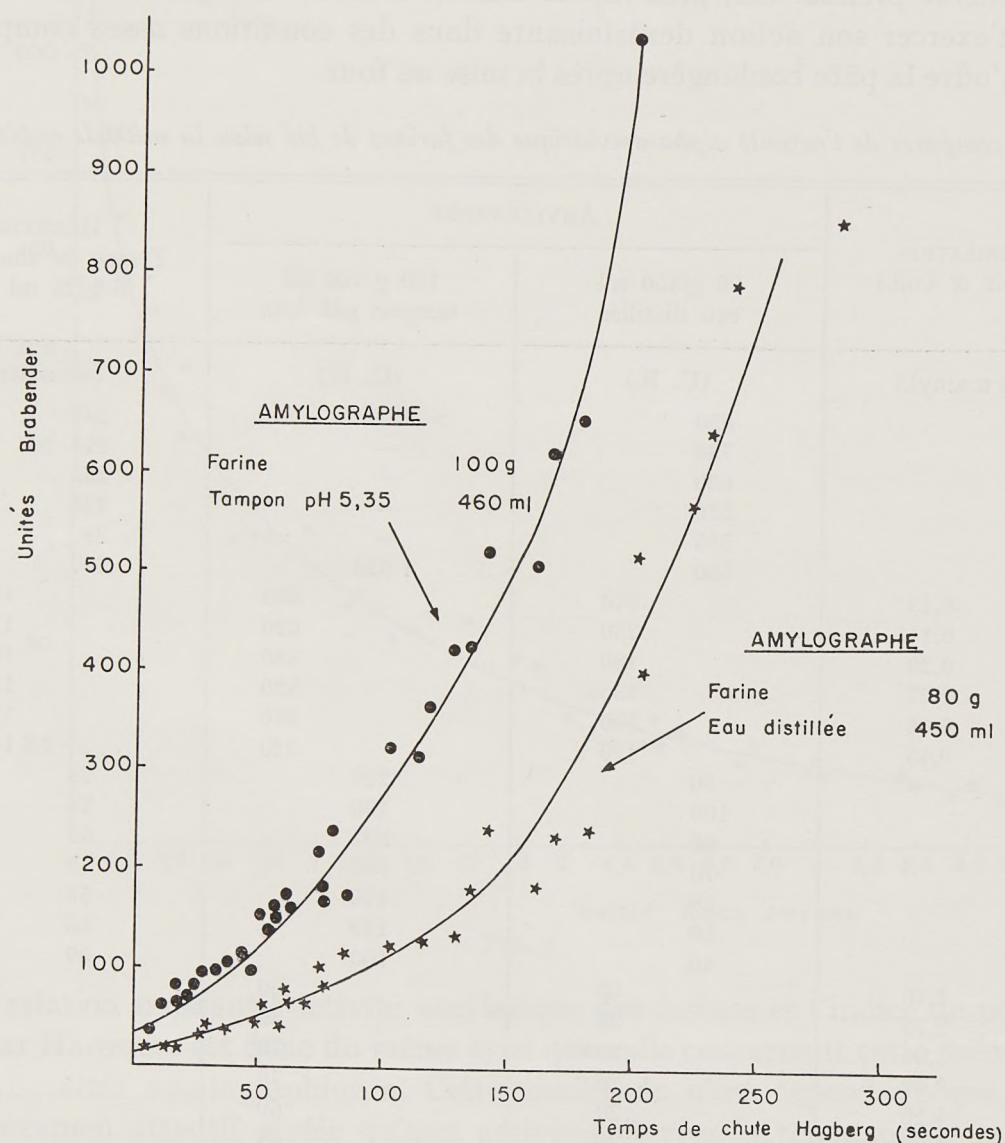
cosité et avec le dispositif de HAGBERG d'apprécier de façon indirecte une consistance. On aboutit ainsi à des modes d'expression de l'activité alpha-amylasique très différents et apparemment sans lien entre eux.

L'emploi d'une méthode conduisant à donner de cette notion d'activité une expression plus spécifiquement enzymatique devait permettre de préciser le sens des unités conventionnelles utilisées sur le plan pratique.

Le fait de pouvoir rapporter ainsi à une même valeur de base les données expérimentales de l'une et l'autre méthode rendait alors possible leur comparaison.

C'est ce que nous avons tenté d'exprimer, en groupant dans le tableau suivant l'essentiel des résultats obtenus dans les conditions déjà exposées.

L'examen des valeurs rapportées ci-dessus permet donc de connaître non seulement l'équivalence en unités alpha-amylase des renseignements fournis par chacune des méthodes, mais encore, sur un plan plus pratique, de relier les données de l'Amylographe à celle de la méthode de HAGBERG, ou vice-versa.



Cette relation apparaît plus clairement encore dans les graphiques de la fig. 6 où les viscosités BRABENDER, déterminées selon deux modes expérimentaux différents, sont exprimées par rapport aux temps de chute.

Les courbes obtenues permettent de constater qu'aux valeurs élevées de viscosité ou de temps de chute (activités faibles) la comparaison entre les deux méthodes est facilitée quand les conditions d'utilisation de l'Amylographe sont celles définies par BRABENDER. Au contraire, pour les viscosités basses et les temps de pénétration courts (activités élevées), cette comparaison peut se faire avec une meilleure précision quand les déterminations amylographiques s'effectuent en solution tamponnée. Dans la zone intermédiaire, correspondant à des activités satisfaisantes du point de vue technologique, la relation entre les deux méthodes peut être établie dans de bonnes conditions, quelle que soit la technique amylographique adoptée, le mode expérimental de l'AACC permettant néanmoins, nous l'avons vu, d'effectuer les déterminations avec une meilleure sensibilité.

IV — CONCLUSIONS

De l'ensemble du travail qui vient d'être exposé, les faits essentiels suivants peuvent être dégagés.

L'emploi de l'Amylographe, dans les conditions expérimentales préconisées par les céréalistes américains, comparativement à celles de la méthode classique définies par BRABENDER, se traduit pour une activité alpha-amylasique donnée, par un accroissement de la viscosité maximum.

Celui-ci résulte principalement d'une augmentation de la concentration en farine et, pour une moindre part, de l'abaissement du pH de la suspension.

Si les conditions de la méthode classique demeurent valables pour les farines insuffisamment diastasiques, il semblerait préférable d'adopter l'autre mode opératoire dans le cas des farines d'activité dextrinisante normale ou excessive. Non seulement la sensibilité des déterminations amylographiques s'en trouverait ainsi améliorée, mais le fait de travailler à pH constant permettrait d'éliminer les variabilités analytiques ayant pour origine la nature de l'eau utilisée.

L'emploi d'une méthode donnant de l'activité dextrinisante des farines une expression plus spécifique a permis de préciser, sur le plan enzymatique, la signification des unités conventionnelles fournies par l'Amylographe.

La même précision a été apportée aux données analytiques d'une autre méthode pratique due à HAGBERG, dans laquelle le pouvoir dextrinisant des farines est exprimé conventionnellement par le temps de chute d'un solide pénétrant d'une certaine distance dans la suspension empesée.

En fournissant à l'une et à l'autre de ces méthodes une base commune d'expression de l'activité alpha-amylasique, il devient possible, non seulement de préciser leur signification respective du point de vue diastasique, mais encore de relier sur le plan pratique les données de l'Amylographe à celles de la méthode de HAGBERG et inversement.

Les résultats obtenus dans cette étude font apparaître que la méthode pénétrométrique de HAGBERG peut constituer un mode d'appréciation pratique de l'activité dextrinisante des farines aussi significatif et, dans une certaine mesure, plus sensible que la technique amylographique, surtout si celle-ci est pratiquée dans les conditions classiques.

En raison même de sa simplicité, de sa rapidité et du matériel relativement peu onéreux qu'elle réclame, la méthode de HAGBERG semble devoir offrir aux techniciens de la meunerie et de la boulangerie un moyen à la fois commode et suffisamment précis pour apprécier l'activité alpha-amylasique ou dextrinisante de leurs farines.

Reçu pour publication en juillet 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANKER C. A., GEDDES W. F., 1944. Gélatinisation studies upon wheat and other starches with the amylograph *Cereal Chem.* **21**, 335.
- BARHAM H. N., WAGONER J. A., REED G. N., 1942. Viscosity of starches. *Ind. Eng. Chem.* **34**, 1490.
- BOURDET A., 1961. Phénomènes amylolytiques en technologie boulangère — 1. Nature et mode d'action des amylases. Moyens d'apprécier leur activité. *Meunerie Franç.*, n° 169, 31.
- BRABENDER C. W., 1937. Beiträge zur Strukturforsshung von Weizen und Roggenteigen. *Mühlenlab*, **7**, 121.
- BRABENDER C. W., MUELLER G., KOSTER A., 1937. Der Amylograph ein Apparat zur Messung der Backfähigkeit von Roggen. *Z. Getreide Mühl Bäcker*, **24**, 168.
- BRABENDER C. W., MUELLER G., HEIDE F., 1938. Standardization of Irish soda bread flour. *Milling*, **90**, 696.
- BRIMHALL B., HIXON R. M., 1942. Interpretation of viscosity measurements on starch pastes. *Cereal Chem.*, **19**, 425.
- BROWN R. O., HARREL C. G., 1944. The use of the Amylograph in the cereal laboratory. *Cereal Chem.* **21**, 360.
- CAESAR G. V., 1932. Consistency changes in starch pastes. *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 1432.
- CAESAR G. V., MOORE E. E., 1935. Consistency changes in starch pastes. *Ind. Eng. Chem.*, **27**, 1447.
- COUPEROT G., BERGAULT J. P., 1958. Etude des blés avariés par germination. *Bull. Ass. Anc. Élèves E. F. M.*, n° 168, 277.
- DUBOIS M., WILLM C., 1958. Blés germés de la récolte 1956. Action de l'alpha-amylase. *Bull. Ass. Anc. Élèves E. F. M.*, n° 164, p. 65.
- GEOFFROY R., 1956. Détection de l'avarie par germination dans les blés et farines. *Bull. Ass. Anc. Élèves E. F. M.*, n° 155, 209 ; n° 156, 267.
- HAMPL J., 1959. Einige neue Beobachtungen über das Verhalten von Roggen und Weizenmehlsuspensionen im Amylographen. *Getreide u. Mehl*, **9**, 86.
- JOHNSON J. A., SHELLENBERGER J. A., SWANSON C. O., 1946. Amylograph curve characteristics of various types of commercial flours and their relation to flour maltose and gassing power values. *Cereal Chem.*, **23**, 410.
- JOHNSON J. A., 1954. Amylograph standardization. *Trans. A. A. C. C.*, **12**, 292.
- LEMMERZAHN J., 1955. Bestimmung der Auswuchsschädigung nach der Dextrin methode. *Deutsche Muller Zeit.*, **53**, 384.
- LOSKA S. J., 1957. The effect of bowl speed upon amylogram curve characteristics. *Cereal Chem.*, **34**, 305.
- LOSKA S. J., DAY, 1956. The heating characteristics of an amylograph. *Cereal Chem.*, **33**, 266.
- MANGELS C. E., MARTIN J. J., 1935. Effect of different buffers and type of substrate on the diastasis of wheat starch. *Cereal Chem.*, **12**, 256.
- MARNETT L. F., SELMAN R. W., SUMNER R. J., 1948. A modified amylograph method for the rapid determination of flour amylase activity. *Cereal Chem.*, **25**, 127.
- SANDSTEDT R. M., KNEEN E., BLISH M. J., 1939. A standardized Wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. *Cereal Chem.*, **16**, 712.
- SCHMIDT E. A., SCHOLZ H., 1938. Der Einfluss der Griffigkeit des Roggenmehles und Feinheitsgrades des Roggenschrotes auf die Verkleisterungsfähigkeit der Stärke. *Mühlenlab*, **8**, 185.
- SCHOLZ H., 1940. Über die Deutung der Amylogrammkurven. *Z. Getreidewissen*, **27**, 23.
- SELMAN R. W., SUMMER R. J., 1947. The use of the amylograph for flour malt control. *Cereal Chem.*, **24**, 291.
- WOHLGEMUTH J., 1908. Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des diastatischen Ferments. *Biochem. Z.*, **9**, 1.

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES MATIÈRES COLORANTES DES VINS ROUGES

H. BIOL et A. MICHEL

Station œnologique, Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, Beaune.

SOMMAIRE

Dans ce premier mémoire, dont les résultats ont été obtenus en 1960, les auteurs exposent la technique chromatographique mise au point et utilisée pour l'identification et l'appréciation visuelle des matières colorantes de vins nouveaux et vieux issus de *Vitis vinifera* et de quelques hybrides.

Ils étudient, en particulier, quelques colorants de référence et proposent, comme témoin migrant, l'utilisation d'un vin d'hybride riche en malvoside étalonné par rapport à un colorant chimiquement pur.

Ils concluent à l'absence de diglucoside malvoside dans les vins de pinot et ceux de gamays à jus blancs et teinturiers cultivés en Bourgogne.

I. — INTRODUCTION

Pascal RIBÉREAU-GAYON (1959) et les chercheurs qui ont appliqué la chromatographie ascendante unidimensionnelle sur papier à l'identification des matières colorantes des vins rouges ont conclu que le diglucoside malvoside serait caractéristique des espèces américaines *V. riparia* et *V. rupestris*. Les produits issus de leurs croisements avec *V. vinifera* présenteraient ce caractère qui serait transmissible suivant les lois classiques de l'hybridation.

C'est en se basant sur ces conclusions qu'a été entrepris le présent travail intéressant non seulement la technique chromatographique proprement dite, mais également les observations personnelles relevées au cours de l'application de cette méthode à des vins rouges de diverses natures.

II. — LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE

Nous avons eu recours à la chromatographie ascendante à une dimension telle qu'elle avait été discutée et adoptée lors de la réunion d'experts qui s'est tenue à Paris le 9 décembre 1959 (JAULMES et NEY, 1960, GROHMANN et GILBERT, 1959).

Mais le solvant citrique de P. RIBÉREAU-GAYON présente l'inconvénient de faire apparaître, en lumière de Wood, une frange fluorescente jaune à hauteur des colorants diglucosidiques. Nous l'avons abandonné au bénéfice du solvant de BRITTON et ROBINSON d'un développement net et sans frange.

Et pour fixer un seuil minimum de sensibilité permettant une comparaison valable entre laboratoires, plusieurs colorants ont été étudiés.

Tout d'abord la *rhodamine B* qui a été rapidement abandonnée car sa teinte sous U. V. était trop éloignée de la fluorescence rouge brique du diglucoside malvoside.

Ensuite, le *pinacyanol*, synthétisé par M. NEY, a été expérimenté suivant les recommandations de MM. JAULMES et NEY. On doit toutefois remarquer que ces auteurs n'apportaient, dans le travail original, aucune précision sur la façon dont doit être réalisée la solution de colorant devant servir de référence. Il était simplement dit que « l'on doit laisser tomber une goutte normale sur le papier. En principe, l'étalement de cette goutte doit être assez uniforme. »

Les critiques que l'on peut adresser à l'endroit de ce colorant sont les suivantes :

1° le pinacyanol n'est pas migrant. Il ne peut donc être utilisé que dans les limites restreintes de la technique précisée par les auteurs. C'est ainsi qu'un chromatogramme de grande dimension demanderait un nouvel étalonnage des concentrations.

2° à partir d'une certaine concentration (indice conventionnel supérieur à 12), la fluorescence devient brillante et la teinte s'éloigne de plus en plus de celle du diglucoside malvoside naturel.

3° l'évaporation trop rapide de l'alcool risque de concentrer le colorant si on ne respecte pas scrupuleusement la technique précise de MM. JAULMES et NEY.

Nous avons également essayé le *Bleu de Bromophénol* (BBP) tel qu'il est préparé pour être employé comme révélateur sur les chromatogrammes des acides fixes des vins ainsi que sur diverses dilutions de cette solution.

La teinte du BBP se rapproche beaucoup de celle des colorants naturels diglucosidiques et elle présente l'avantage d'être mate. Mais à partir de concentrations élevées, la teinte devient nettement plus rouge.

Ce colorant peut être utilisé comme le pinacyanol mais il a, comme ce dernier, l'inconvénient de ne pas être migrant.

Étalonnage des colorants de référence.

L'étalonnage des matières colorantes de référence peut également faire appel à un vin d'hybride riche en diglucoside malvoside comme l'*Oberlin*.

À l'origine, l'*Oberlin* que nous utilisions était dilué dans un vin de *V. vinifera*-support (*Gamay*, *Pinot*, etc...) dans des proportions connues. Par la suite, nous avons préféré diluer l'*Oberlin* dans un tampon citrique (citrate de sodium + HCl) à pH 3 alcoolisé à 15° de meilleure stabilité.

Cette dilution de référence peut être chromatographiée par comparaison avec les vins étudiés. Toutes conditions étant égales par ailleurs, il devient alors facile de déterminer le pourcentage d'*Oberlin* de référence présent dans le vin étudié. La gamme des dilutions d'*Oberlin* préparée à cet effet reste stable pendant plusieurs semaines à condition d'être conservée à l'abri de la lumière et de l'air.

On objectera inévitablement que, compte tenu de ce que l'*Oberlin* n'est pas un produit de composition constante dans sa constitution et la concentration de ses colorants naturels, cette technique est critiquable. Mais il est toujours possible de tourner cette difficulté en établissant une échelle conventionnelle de colorants purs, telle que le pinacyanol qui servira de référence par rapport à un vin d'*Oberlin*-type qui peut être étalonné. C'est ainsi que sera résolu le problème du colorant migrant que nous estimons indispensable à une bonne interprétation de la fluorescence rouge-brique du diglucoside malvoside naturel. La tenue de l'*Oberlin*-étalon peut être vérifiée tous les 15 à 20 jours.

Il est toutefois bon de noter que si nous nous référons à la dilution d'*Oberlin* utilisée par MM. JAULMES et NEY comparativement à nos résultats, on doit reconnaître que cet *Oberlin* que nous leur avons procuré est d'une intensité colorante nettement plus faible. Ceci ne peut résulter que d'un « vieillissement » prématuré dont l'oxydation doit être tenue pour responsable.

Le Docteur BIEBER (1960) du laboratoire de Wurzburg a donné la préférence à la *malvine*, diglucoside naturel préparé par le Docteur DIEMAIR du laboratoire de Francfort.

Quoiqu'il ait été fait le reproche de ne pas être un produit chimiquement pur, la *malvine* dont un échantillon nous a été aimablement fourni par le Dr BIEBER, a été expérimentée comparativement au pinacyanol et à notre *Oberlin* de référence. Il s'agit d'un colorant migrant dont la teinte fluorescente est voisine de celle obtenue avec l'*Oberlin*.

Ces essais ont été effectués en alignant les teintes des taches d'*Oberlin* et de *malvine* avec celles du pinacyanol selon la technique suivante :

- Papier Schleicher, solvant tampon Britton-Robinson ;
- Taches de 2 cm × 0,5 cm, soit 1 cm² ;
- Séchage à l'air chaud à 40° C environ ;
- Solution de *malvine* à 200 mg/l ;
- Examen sous lumière de Wood, lampe Mazda.

Correspondances obtenues entre les trois colorants fluorescents :

Pinacyanol mg/l.	p. 100 <i>Oberlin</i> de référence	Malvine en gamma-tache
1	1	1,5
2	2	3,2
3	3	4,4
4	4	7,5
5	5	9,6
Rf = —	0,35	0,34

Nous avons également utilisé la malvine sans migration, suivant la technique de la goutte déposée sur le papier sans développement. Il a été ainsi déposé successivement et après séchage de chaque goutte, 1, 2, 3 et 4 gouttes de solution-mère de malvine. L'examen sous U. V. a permis d'observer que ces taches n'étaient pas comparables avec celles du pinacyanol. Les colorations de ces deux produits sont nettement différentes, les taches de malvine étant plus orangées que rouge brique. Par contre, si la malvine est développée avec le tampon de BRITTON-ROBINSON, il y a une excellente similitude de coloration, mais avec l'avantage indiscutable que ce colorant est mat et migrant. Aussi, lui accordons-nous notre préférence malgré le reproche qui lui est adressé.

Appréciation de la fluorescence.

Nous avons effectué différents essais de sensibilité visuelle à la fluorescence en faisant appel à deux types de lampe à U. V. : la lampe classique Mazda MAW 125 et la lampe américaine de minéralogiste « Mineralight » de longueur d'onde 253,7 m/μ.

Ces examens ont porté sur des taches obtenues avec des solutions des trois colorants retenus : pinacyanol, malvine et *Oberlin*.

Après ces mises au point, nous avons décidé de nous limiter, au début de nos recherches, à détecter la présence ou l'absence de diglucosides fluorescents en lumière U. V., en prenant pour étalon de référence, un vin d'*Oberlin* vinifié par nous et incorporé, dans diverses proportions, à un vin de *V. vinifera* (*Pinot noir*) toujours exempt de diglucosides, donc sans trace de fluorescence.

C'est ainsi qu'ont été retenues les normes arbitraires suivantes :

A = *absence* de diglucoside ;

D = *douteux*, dans les cas où des trainées marron-rougeâtres dues au manque de propreté du vin, à l'oxydation de vin vieux, à la présence de vins teinturiers, gênaient la visibilité de l'examen en lumière ultra-violette.

T = *traces*, marquant la limite de sensibilité visuelle en U. V., soit 0,5 p. 100 maximum de notre vin de référence.

PL = *Présence légère*, correspondant à 1 p. 100 environ du vin de référence.

PM = *présence moyenne*, correspondant à 2-3 p. 100 du vin de référence.

PF = *présence forte*, correspondant à plus de 3 p. 100 du vin de référence.

Pour tous les examens classés A, D ou T, soit moins de 1 p. 100 de vin d'*Oberlin* dans le vin de *Pinot noir*, ces examens ont été admis être pratiquement négatifs, c'est-à-dire privés de diglucosides.

Pour les examens classés PL, PM ou PF, la réaction fluorescente a été reconnue comme positive.

III. — LES RÉSULTATS

C'est selon ces normes que nous avons examiné successivement :

A. — Quelques vins d'hybrides ou de *V. vinifera* vieux :

a) en mauvais état de conservation ;

b) en bon état de conservation.

B. — Quelques vins d'hybrides vinifiés à l'état pur en 1959.

C. — Quelques vins de *V. vinifera* vinifiés à l'état pur en 1959.

Les résultats observés ont été les suivants :

A. — Vins d'hybrides et de *V. vinifera* vieux :

a) en mauvais état de conservation (échantillons en vidange).

	Nom, N° de l'hybride et type de vin	Aspect du vin	Réaction diglucosidique sous lumière de Wood
Burdin	4077	rose net	A
	4503 rouge	rose clair passé	T
	4601 rosé	blanc taché	A
	4601 rouge	rouge clair vif	D
	4687 rosé	rose clair jaune	T
Landot	244 rouge	rouge soutenu	A
	2283 rosé	jaune taché	PL
Ravat	15 rosé	rose terne	A
	16 rosé	jaune taché	A
Seibel	11257 rouge teinturier	rouge foncé	PF
	11257 rosé	rose saumon	PF
	13053 rouge	rancio	PF
	13053 rosé	jaune rosé	PL
	13669 rouge	rose franc	D
	13669 rosé	jaune clair	A
	14164 rosé	rose violacé	A
	14596 rosé	saumon	A
J. Seyve	24130 rouge	rouge foncé	PL
	24397 rosé	jaune taché	TF
	24444 rosé	saumon	PL
	26654 rosé	jaune doré	A
Seyve-Villard	12347 rosé	rose saumon	T
	19233 rouge	rouge rancio	D
	19410	jaune taché	PL
	23120 rosé	saumon	T
	23359 rosé	saumon	PF

b) en bon état de conservation.

<i>Année 1953</i>			
Seibel	3474	rouge foncé vif	D
	5455	oxydé	A
Rudelin	1547	rouge oxydé	PL
	1118	oxydé	T
Landot	2517	pelure d'oignon	A
	1678	oxydé	D
	4511	oxydé	PF
Seyve-Villard	18315	rouge oxydé	PF
Burdin	4716	pelure d'oignon	PL
Cabernet		rouge oxydé	A
Malbec		rouge soutenu	A
<i>Année 1954</i>			
Seibel	1096	pelure d'oignon	D
	14109	rouge clair oxydé	A
Landot	4411	rouge oxydé	D
	4511	rouge oxydé	PF
Burdin	7206	rouge foncé	D
Seyve-Villard	1915	rouge moyen oxydé	T
Gamay		rouge vif	A
Malbec		rouge foncé	A
<i>Année 1955</i>			
Landot	244	rouge foncé oxydé	D
	3381	rouge moyen vif	A
Dounoir Galibert		rouge oxydé	A
Seibel	8357	noir violacé	PL
J. Seyve	26205	noir violacé	PF
Fauconneau		noir violacé	PF
Seyve-Villard	19159	foncé vif	T

Exception faite de ce travail préliminaire sommaire, nous étions surtout intéressés par la recherche de l'influence de l'oxydation et indirectement de l'âge des vins sur la tenue des mono et diglucosides des colorants naturels.

Sur tous les vins issus de ces cépages, les taches chromatographiques examinées sous lumière ultra-violettes sont peu visibles, mais il semble que les colorants diglucosidiques résistent mieux que les colorants monoglucosidiques au vieillissement et à l'oxydation naturelle tout en s'atténuant et en passant du rouge brique à l'orange.

Sur les chromatogrammes de plus de six mois, mais effectués sur des vins jeunes bien conservés, on observe le même phénomène consécutif à leur oxydation par suite de séjours renouvelés sous lumière ultra-violettes.

B. — Vins d'hybrides vinifiés en 1959.

	N° de l'hybride et type de vin	Réaction diglucosidique sous lumière de Wood
	—	—
Burdin	7061 rouge	PF
Kuhlmann	188-2 rouge	PF
Ravat	262 rouge	PF
Oberlin	595 rouge	PF
Burdin	7705 rouge	A
Landot	244 rouge	A
Seibel	5455 rouge	A

C. — Vins de *V. vinifera* vinifiés en 1959.

	Désignation du cépage	Réaction diglucosidique sous lumière de Wood
	—	—
	Pinot noir fin de Bourgogne	A
	Gamay à jus blanc du Beaujolais	A
	Gamay à jus rouge Castille	A
	Gamay à jus rouge Fréaux ordinaire	A
	Gamay à jus rouge Fréaux hâtif	A
	Gamay à jus rouge de Chaudenay	A
	Gamay à jus rouge de Bouze	A

En Bourgogne, les cépages rouges producteurs de vins d'A. O. C. sont peu nombreux. Aussi, les avons-nous examinés facilement, et dans les centaines de vins purs chromatographiés, nous n'avons jamais décelé la moindre trace de diglucoside fluorescent rouge.

Un cas particulier se présentait en ce qui concerne les *gamays teinturiers*. Aussi était-il intéressant de connaître leur comportement chromatographique. Les résultats rapportés dans le tableau ci-dessus sont indiscutables puisque, quelles que soient leur sélection et leur nature, les *gamays teinturiers* sont privés de colorant diglucoside malvoside. Cette conclusion a d'ailleurs été confirmée sur ces mêmes cépages dont les vins ont été soumis au Professeur BIEBER de Wurzburg.

Pour conclure, on peut dire que tous les vins rouges d'A. O. C. issus des cépages *Pinot et Gamays* originaires de Bourgogne (Côte-d'Or, Saône-et-Loire et Rhône), ne contiennent pas de malvoside et que, si cette réaction existe sur certains chromatogrammes, elle ne peut être que le fait d'un apport étranger à ces cépages nobles.

Sur le plan pratique, en utilisant la technique chromatographique adoptée par la commission ad hoc réunie à Paris en décembre 1959, la fluorescence diglucosidique est sensible à partir de 0,5 p. 100 de vin d'hybride *Oberlin* de référence.

IV. — CONCLUSIONS

Nos observations ont conduit aux conclusions suivantes :

a) La tache 1 mg/l de pinacyanol est pratiquement invisible avec la lampe Mazda, mais nettement visible avec la lampe Mineralight. Quant aux autres gammes, elles restent comparables.

b) La limite de tolérance que nous envisageons en fonction de l'*Oberlin* de référence, pourrait être de 1 p. 100 d'un bon *Oberlin* non oxydé représentant 3 mg de pinacyanol.

c) A partir de la concentration de pinacyanol 12 mg/l, il devient difficile d'établir une correspondance avec la malvine, le premier de ces colorants étant plus rouge et plus brillant que le second.

d) La lampe « Mineralight » exaltant les fluorescences, nous lui accordons la préférence.

Une autre observation personnelle qui nous paraît présenter un certain intérêt mérite d'être retenue, c'est celle qui consiste à améliorer très sensiblement la visibilité des taches fluorescentes en les examinant avec des lunettes munies de verres jaune moyen et anti U. V.

Notons, pour terminer, qu'il importe que l'opérateur soit sensible aux colorations et ne présente aucune aberration de la vue comme le daltonisme beaucoup plus fréquent qu'on peut le croire.

Dans l'état actuel de la question, il n'existe aucun colorant de référence idéal. Par contre, nous pensons que la solution intermédiaire que nous avons proposée par comparaison entre les différents colorants expérimentés puisse servir de base d'étalonnage pour juger de l'intensité de la fluorescence des vins renfermant des hybrides à diglucoside malvoside.

Reçu pour publication en mai 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIEBER H., 1960. Der papierchromatographische Nachweis von rotem Hybridenfarbstoff. *Wein und Rebe*, **96**, 104.
 GROHMANN H., GILBERT E., 1959. Contribution à l'identification des pigments rouges des hybrides par chromatographie sur papier. *Deuts Wein-Zeitung*, **95**, 346.
 JAULMES P., NEY., 1960. Recherche des vins d'hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Fals. Fr.*, **53**, 180-183. Complété par erratum, **53**, 378.
 RIBEREAU-GAYON P., 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. *Thèse Doct. Sci.* Édit. Librairie Générale de l'Enseignement, Paris.

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES APPLIQUÉES A LA DIFFÉRENCIATION DES MATIÈRES COLORANTES DES VINS ROUGES

H. BIOL et A. MICHEL

Station œnologique, Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, Beaune.

SOMMAIRE

Les Auteurs étudient différentes techniques et expérimentent de nombreux solvants. Ils font également la critique de méthodes actuellement proposées.

En conclusion, ils préconisent deux techniques : une méthode rapide à sensibilité limitée et une méthode plus délicate mais à grande sensibilité.

Des essais de photographie des chromatogrammes en lumière ultra-violette ont été réalisés sur films en noir et en couleur. Les Auteurs précisent finalement la technique photographique qui leur paraît actuellement la plus sensible.

I. — INTRODUCTION

Des chercheurs, tant français qu'étrangers, ont étudié la chromatographie des matières colorantes des vins rouges en ayant recours à des techniques et à des solvants aussi divers que nombreux.

Aussi a-t-il été jugé nécessaire d'en faire un examen systématique dans le but de fixer les méthodes et les solvants les plus appropriés à ces recherches.

Enfin, la photographie en noir et en couleur sous lumière ultra-violette a paru indispensable à la reproduction et à la conservation des chromatogrammes toujours plus ou moins altérables avec le temps.

II. — LES SOLVANTS

La nomenclature ci-dessous (tableau 1) donne la composition des solvants expérimentés. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 2 pour les seuls solvants ayant présenté quelque intérêt. (BIEBER H., 1960 ; HARBONNE J. B., 1958 ; MARICHAL M., 1956 ; PARIS R. et Melle ROUSSELET R., 1958).

TABLEAU I

Composition des solvants.

N° 1. — Tampon de BRITTON-ROBINSON : pH = 1,81 Acide phosphorique pur 3,92 g Acide acétique pur 2,40 g Acide borique cristallisé 2,48 g Eau distillée, qs 1 000 ml	N° 12. — Tampon phtalate acide de K, pH = 5,2 Phtalate N/20 20 ml Hydroxyde de sodium N/5 2,5 ml
N° 2. — Butanol-chlorhydrique (BIEBER) Butanol 1 vol. Acide chlorhydrique 2 N 1 vol. Agiter dans une ampoule à décanter. Jeter la phase inférieure et filtrer la phase supérieure qui peut servir 15 jours.	N° 13. — Tampon de CLARK et LUBS, pH = 2,60 Phtalate acide K, N/5 250 ml Acide chlorhydrique N/5 164,7 ml Alcool à 95° 52,6 ml
N° 3. — Solvant de DIEMAIR-SENCEWALD Acide acétique pur 3 vol. Acide chlorhydrique concentré . 1 vol. Eau 8 vol.	N° 14. — Tampon de CLARK et LUBS, pH = 3,60 Phtalate acide K, N/5 250 ml Acide chlorhydrique N/5 29,8 ml Alcool à 95° 52,6 ml Les tampons au citrate de soude de SÖRENSEN Dissoudre 21,008 g d'acide citrique pur dans q.s. eau = 500 ml. A cette solution, ajouter 200 ml d'hydroxyde de sodium N et compléter à 1 000 ml.
N° 4. — Butanol-acétique (DIEMAIR-BIEBER). Butanol 6 vol. Acide acétique pur 2 vol. Eau 3 vol.	N° 15. — Tampon au citrate de soude, pH = 2,3 Citrate de soude 3,33 ml Acide chlorhydrique N/10 6,67 ml
N° 5. — Tampon pH = 2,6 Acide formique à 29% 200 ml Sulfate d'Am. pur 250 g Ammoniaque 30 ml Eau 600 ml	N° 16. — Tampon au citrate de soude, pH = 3,0 Citrate de soude 4 ml Acide chlorhydrique N/10 6 ml
N° 6. — Tampon pH = 3,2 Phosphate monopotassique 150 g Acide phosphorique sirupeux 5 ml Eau, qs 1 000 ml	N° 17. — Tampon au citrate de soude, pH = 3,5 Citrate de soude 4,70 ml Acide chlorhydrique N/10 5,30 ml
N° 7. — Tampon de MICHAELIS pH = 4,62 Acide acétique N 100 ml Hydroxyde de sodium N 50 ml Eau, qs 500 ml	N° 18. — Solvant de THALER et SOMMER Citrate de soude pur 2 g Ammoniaque 5 g Eau, q.s. 100 ml
N° 8. — Tampon phosphaté pH = 5,80 Phosphate monopotassique 6,81 g Hydroxyde de sodium N/5 18,6 ml Eau, qs 1 000 ml	N° 19. — Solvant de LHOEST Butanol normal 2 vol. Ethanol 1 vol. Eau 1 vol.
N° 9. — Tampon phtalate acide de K, pH = 2,38 Phtalate N/20 20 ml Acide chlorhydrique N/5 4 ml	N° 20. — Solvant de DREVON et LAUR Butanol normal 5 vol. Ethanol 2,5 vol. Eau 2,5 vol. Ammoniaque officinale 1 vol.
N° 10. — Tampon phtalate acide de K, pH = 3,01 Phtalate N/20 20 ml Acide chlorhydrique N/5 1,9 ml	N° 21. — Solvant de SALATI Isobutanol 4 vol. Acide acétique 1 vol. Ethanol 2 vol. Eau 5 vol.
N° 11. — Tampon phtalate acide de K, pH = 4,01 Phtalate N/20 20 ml Hydroxyde de sodium N/5 0,05 ml	N° 22. — Solvant Forestal de BATE-SMITH Eau distillée 10 vol. Acide acétique 30 vol. Acide chlorhydrique concentré . 3 vol.

TABLEAU I (*suite*)

N° 23. — Solvant de BATE-SMITH		N° 33. — Solvant FOUASSIN N° 4 (phase crésol).	
Métacrésol	1 vol.	Métacrésol	50 vol.
Acide acétique	1 vol.	Eau	48 vol.
Acide chlorhydrique 5,5 N	1 vol.	Acide acétique	2 vol.
N° 24. — Solvant de FOUASSIN. N° 1		N° 34. — Solvant FOUASSIN n° 5 (phase alcoolique)	
Métacrésol	2 vol.	Isobutanol	1 vol.
Acide acétique 12 N	1 vol.	Acide acétique 3 N	1 vol.
Acide chlorhydrique 6 N	1 vol.		
N° 25. — Solvant de FOUASSIN. N° 2		N° 35. — Solvant PARIS-ROUSSELET	
Acide acétique 12 N	2 vol.	Butanol normal	1 vol.
Acide chlorhydrique 6 N	1 vol.	Pyridine	1 vol.
		Eau	1 vol.
N° 26. — Solvant de FOUASSIN. N° 3		N° 36. — Butanol normal	4 vol.
Isobutanol	1 vol.	Ethanol	1 vol.
Acide chlorhydrique 6 N	1 vol.	Eau	5 vol.
N° 27. — Solvant chlorhydrique		N° 37. — Acétate d'éthyle.....	9 vol.
Acide chlorhydrique N		Acide acétique	2 vol.
N° 28. — Solvant de RENTSCHLER		Eau	2 vol.
Acide formique à 1 %			
N° 29. — Méthanol à 25 %		N° 38. — Propanol normal	1 vol.
N° 30. — Acide acétique 12 N		Acide acétique	1 vol.
		Eau	1 vol.
N° 31. — Solvant de P. RIBÉREAU-GAYON		N° 39. — Vin rouge sec décoloré au noir animal	
Acide citrique	6 g/l	N° 40. — Vin rouge sec décoloré ..	
N° 32. — Butanol acétique à deux phases :		au noir	20 ml
a) selon P. RIBÉREAU-GAYON :		Acide phosphorique sirupeux ...	0,5 ml
Butanol normal	4 vol.	N° 41. — Solution aqueuse d'acide	
Acide acétique	1 vol.	phosphorique sirupeux à	2,5 ml%
Eau	5 vol.	N° 42. — Solution aqueuse de nitrite	
b) selon C. LAMORT :		de soude à	5 %
Butanol normal	4 vol.		
Acide acétique	1 vol.		
Eau	2,5 vol.		

III. — TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

I — Conditions générales.

Toutes les conditions précédemment définies quant à la nature du papier, la température de développement, le volume des taches, etc... ont été respectées. L'examen des chromatogrammes sous lumière U.V. est toujours réalisé avec les deux types de lampes adoptées : Mazda et Mineralight (BIOL-MICHEL, 1961).

La table de travail est conçue pour utiliser des papiers de divers formats et qui, posés à plat entre deux lames d'Isorel, ne subissent aucune traction ni déformation.

Une fente permet la réalisation commode des taches, tout en laissant passer un courant d'air de séchage froid ou chaud (généralement à 35°C environ). Le système ne comporte aucun élément fragile, et peut être de ce fait aisément transporté.

2 — Influence des sucres.

Lors d'essais directs, avec le solvant de Bieber (N° 2), sur des jus de raisin non désucrés, il a été constaté une fluorescence orangée intense qui a paru anormale. Des essais systématiques ont alors été effectués dans le but de vérifier s'il ne s'agissait pas de la conséquence d'une réaction entre solvant et sucres. Ils ont porté sur des vins de *Vitis vinifera* à jus blanc et rouge, les uns à l'état pur, les autres contenant une faible proportion de vin d'hybride.

Sur chaque papier ont été disposées deux séries de trois vins :

— Série sans sucre :

Pinot noir à jus blanc.

Pinot noir à jus blanc + 2 p. 100 d'Oberlin.

Gamay teinturier Castille.

— Série avec sucre (75 g/l de lévulose ou de glucose) :

Pinot noir à jus blanc.

Pinot noir à jus blanc + 2 p. 100 d'Oberlin.

Gamay teinturier Castille.

Une fluorescence rouge orange plus ou moins intense est apparue, à l'examen sous lumière U.V., sur les chromatogrammes des échantillons qui auraient dû normalement en être dépourvus.

Quant aux chromatogrammes des échantillons contenant une faible proportion de vin d'hybride, ils présentèrent un renforcement notable de leur fluorescence par rapport au témoin.

Le solvant N° 22 a également donné cette réaction.

Ces deux solvants contenant de l'acide chlorhydrique, il était tentant d'établir un rapprochement entre ces faits. Mais d'autres solvants contenant également de l'acide chlorhydrique n'ont pas provoqué le même phénomène.

En conclusion, il faut retenir que l'emploi de certains solvants nécessite un désucrage préalable, par purification chimique ou par fermentation. La contre-expérience en a été significative.

En plus de cette réaction, les sucres créent des perturbations par effet de barrage, rendant illisibles les chromatogrammes (traînées, déviations, etc...). Cependant, certains solvants ne sont pas très affectés par la présence de sucres : c'est le cas des N° 1, 6 et 17.

3 — Procédés de purification et de concentration des matières colorantes.

Les essais ont porté sur un vin de *Pinot* contenant 2 p. 100 d'Oberlin. Quatre procédés ont été éprouvés comparativement entre eux, et par rapport au témoin non purifié ni concentré ; une légère modification a parfois été apportée au processus normal, afin d'avoir une concentration connue des matières colorantes.

Sur un même papier ont été faites des taches du témoin et des divers concentrés, de manière à obtenir des concentrations de matières colorantes équivalentes.

Des résultats de l'examen chromatographique, il a été possible de vérifier si les techniques expérimentées se traduisent par des pertes de diglucosides et de retenir le meilleur procédé de concentration.

Procédés expérimentés. Résultats et conclusions. — Les techniques employées ont rendu, en pourcentage d'hybride (exprimé en *Oberlin*) les résultats suivants :

Technique de A. P. MATHERS utilisée par M. MARICHAL.....	1 %
Technique de DIEMAIR-SENCEWALD	2 %
Technique de DIEMAIR-SENCEWALD modifiée par BIEBER	2 %
Technique de RENTSCHLER.....	traces

Ce sont les deux techniques de DIEMAIR-SENCEWALD (d'origine et modifiée par BIEBER) qui se sont révélées les meilleures, puisque donnant un pourcentage d'hybride détectable égal à celui du témoin.

Mais ces deux méthodes sont longues. Il a donc été apporté à la technique de DIEMAIR-SENCEWALD une légère modification, qui ne s'est pas soldée par un quelconque préjudice sur la qualité de la purification-concentration.

Le processus en est le suivant :

1° Introduire 30 ml de vin dans un tube à centrifuger de 50 ml + 5 ml d'acétate neutre de plomb à 10 p.100. Agiter. Centrifuger à 3 500 t/m pendant 1 minute.

2° Décanté le liquide dans un deuxième tube. Ajouter quelques gouttes d'ammoniaque concentrée. Agiter. Centrifuger. Le liquide est jeté.

3° Le précipité est remis en suspension dans 10 ml de méthanol. Centrifuger. Jeter le liquide.

4° Le précipité est additionné de 2 ml de méthanol et de 5 gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Bien remettre en suspension avec un agitateur. Centrifuger 1 minute.

Si l'on opère correctement, il n'y a pas d'eau, donc pas nécessité de poursuivre les opérations. Avec une pipette à écoulement total, on peut évaluer le volume du concentré, et, en ajoutant du méthanol au 1/2, réaliser une concentration connue (10 fois par exemple). Ces opérations nécessitent une heure de travail pour un seul échantillon.

S'il y a présence d'eau :

5° Le liquide rouge est décanté dans un bécher de 50 ml avec 30 ml d'éther. L'eau est éliminée après 30 minutes de repos.

6° Évaporer l'éther dans un courant d'air, ajouter 0,5 ml de méthanol à 5 p.100.

Le concentré peut être chromatographié.

Ces méthodes, qu'elles soient ou non modifiées, sont néanmoins longues. Elles ne semblent donc présenter d'intérêt que pour la résolution de problèmes d'expertise, de cas d'incertitude notoire, ou de vins (ou de jus) riches en sucres.

B — EXPOSÉ DES TECHNIQUES ET RÉSULTATS

Les trois types courants de chromatographie sur papier ont été expérimentés.

1 — Chromatographie ascendante unidimensionnelle.

La chromatographie des six vins a été conduite selon la technique décrite précédemment.

TABEAU 2
Appréciation de la qualité des solvants quant à la différenciation des diglucosides.

N° des solvants	Essai sans sucre				Essai avec sucre				Durée de développement	Appréciations diverses
	Rf	Surface en cm² de la tache de diglucoside	Correspondance en pinaeyanol mg/l	Appréciation de la qualité visuelle de la tache	Rf	Surface en cm² de la tache de diplocoside	Correspondance en pinaeyano mg/l	Appréciation de la qualité visuelle de la tache		
1	0,40	4,6	6	Bonne	0,36	4,4	7	Assez bonne	1 heure	Bon solvant.
2	0,08	4,26	17	Très bonne	0,40	2,0	24	Médiocre	6 heures	Les sucres gênent ce solvant et provoquent des fluorescences parasites. Le meilleur solvant sur vins sans sucres.
3	0,64	4,2	6	Bonne	0,60	3,7	7	Légères déformations	2 heures	Assez bon solvant.
6	0,28	4,0	8	Bonne	0,27	3,6	9	Bonne	1 h 30	Séparations très nettes. Peu sensible aux sucres.
17	0,41	5,4	8	Bonne	0,39	5,2	10	Bonne	1 h 10	Bon solvant. Même avec le sucre.
31	0,43	4,8	4	Assez bonne	0,43	5,4	4	Assez bonne	1 h 10	Solvant de qualité moyenne.
40			6						2 heures	Assez bon solvant.

Tous les autres solvants se sont révélés sans intérêt.

L'intérêt essentiel porte sur le *Pinot noir* à jus blanc additionné de 2 p.100 d'*Oberlin* (avec ou sans sucre), car l'expérimentation permet d'apprécier la qualité des 42 solvants sur la différenciation du diglucoside malvoside.

Les résultats de ce travail, consignés dans le tableau 2, montrent qu'il n'y a que peu de solvants valables en chromatographie ascendante unidimensionnelle. Par ordre de différenciation décroissante du 3.5 diglucoside malvoside, ils peuvent être classés comme suit :

N° 2, 6, 17, 1, 3, 40, 31. Les autres donnant des résultats très médiocres, voire franchement mauvais.

La plus ou moins bonne différenciation dépend à la fois de la surface de la tache fluorescente, et de la nuance de la fluorescence ; les différents solvants affectent l'une et l'autre ; mais le critère de différenciation est essentiellement basé sur la surface : les solvants les meilleurs sont ceux qui concentrent le plus la matière colorante. C'est le cas du N° 2.

Toutefois, ce solvant étant affecté par les sucres, il convient de ne l'utiliser qu'avec des vins qui en sont exempts. D'autre part, son emploi peut être considéré comme désagréable par certains, du fait des vapeurs qu'il émet. Et surtout son temps de développement est long : 6 heures.

En ce qui concerne les solvants N° 6, 17 et 1, qui ne sont pratiquement pas affectés par les sucres, ils ne présentent pas de vapeurs incommodantes, et ils ont des temps de développement assez courts (1 heure 1/4 à 1 heure 1/2).

2 — Chromatographie circulaire.

Le système de développement est constitué par deux couvercles de boîte de Pétri de 19,5 cm. de diamètre, serrant la feuille de papier qui est découpée en carré de 20 cm de côté.

Le papier est percé en son centre par un trou de 0,6 cm de diamètre, recevant une mèche de papier roulé. Cette mèche plonge dans le solvant contenu dans une coupelle de 5 cm. de diamètre. (fig. 1).

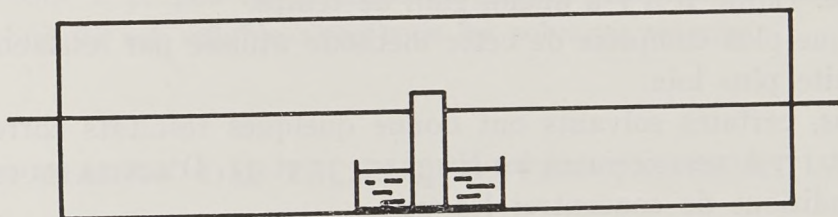


FIG. 1.

Deux cercles concentriques sont tracés à 2 cm et à 9,5 cm du centre.

Le cercle central est partagé en 3 arcs égaux qui reçoivent les vins à chromatographier.

Les essais ont été réalisés avec les trois vins non sucrés qui ont servi dans la première méthode.

Pour que ces essais puissent être comparés aux précédents, les mêmes quantités de vin par cm. de tache ont été employées, soit 25 microlitres.

La durée de développement a été calculée sur le parcours séparant les deux cercles.

Les solvants qui se sont révélés les plus mauvais précédemment ont été éliminés.

— Résultats : ils sont indiqués dans le tableau 3.

Les appréciations qui y sont formulées portent sur la qualité des séparations, et l'intensité de la fluorescence sous lumière ultra-violette.

— Conclusions : solvants valables.

Par comparaison avec la chromatographie ascendante unidimensionnelle, toutes choses restant égales, il ressort que, du fait de l'étalement du diglucoside en développement circulaire, l'intensité fluorescente de la tache est plus faible qu'avec la première méthode.

TABLEAU 3

N° des solvants	Appréciation qualitative	Temps de développement
1	Bonne	1 heure 1/4
2	Très bonne	4 heures 1/4
3	Assez bonne	1 heure 1/2
4	Nulle	3 heures
6	Bonne	1 heure
15	Assez bonne	1 heure
17	Bonne	1 heure
19	Nulle	3 heures 1/2
20	Nulle	3 heures 1/2
21	Nulle	5 heures
22	Nulle	4 heures 1/2
31	Assez bonne	1 heure
32	Nulle	3 heures
34	Nulle	4 heures 1/2
36	Nulle	4 heures
37	Nulle	1 heure 1/4
38	Nulle	4 heures
41	Assez bonne	1 heure

D'autre part, le dispositif est beaucoup plus encombrant et ne permet pas un travail de série. Enfin, il n'y a aucun gain de temps.

Une critique plus complète de cette méthode utilisée par les laboratoires allemands sera faite plus loin.

Néanmoins, certains solvants ont donné quelques résultats corrects. Ce sont les N° 1, 2, 6 et 17. Accessoirement les N° 3, 15, 31 et 41. D'autres seraient peut-être valables à conditions de concentrer les vins.

3 — Chromatographie bidimensionnelle.

L'expérimentation a essentiellement porté sur une comparaison des techniques ascendante et descendante, à seule fin de déterminer celle qui serait susceptible d'être retenue pour des essais ultérieurs. Dans ce but, parmi toute une série de solvants permettant un travail en deux dimensions, seul a été utilisé le butanol acétique déjà expérimenté par P. RIBEREAU-GAYON.

La conclusion des divers essais réalisés est que le solvant utilisé en chromatographie ascendante donne de meilleurs résultats qu'en chromatographie descendante.

Le fait a déjà été constaté en chromatographie des acides organiques du vin, en particulier lorsque le temps de développement est très supérieur au temps néces-

saire pour que le solvant atteigne seulement le sommet de la feuille de papier : en pratique, il n'existe pas d'équilibre à l'intérieur des enceintes, malgré la régularisation de la température et la saturation du milieu. Il s'en suit que le solvant continue à entraîner les matières soumises à son action en les séparant parfaitement, et en évitant les effets de diffusion que l'on observe en développement descendant (en particulier, si on laisse le solvant s'écouler à la base pour augmenter les séparations).

Il est donc préférable d'utiliser la méthode ascendante à durée de développement prolongée : 24 — 30 heures pour chaque dimension.

Cette méthode est très longue, mais elle a l'avantage d'être extrêmement sélective, et ne nécessite pas un appareillage aussi complexe qu'en chromatographie descendante.

4 — *Procédés spéciaux.*

Quelques procédés particuliers ont été également expérimentés :

a) Solvants utilisés en opposition :

Un solvant déplaçant fortement les diglucosides est d'abord utilisé en chromatographie ascendante. Les solvants de BRITTON-ROBINSON ou de SÖRENSEN conviennent parfaitement. Le papier est ensuite séché, coupé à un cm au-dessus de la tache des diglucosides, puis plongé tête en bas dans un deuxième solvant concentrant les diglucosides à la base et repoussant les monoglucosides qui pourraient interférer avec eux. Cette dernière séparation peut être obtenue à l'aide du butanol-chlorhydrique.

Le système a présenté un réel intérêt en présence de vins de cépages teinturiers.

b) Solvants successifs en superposition :

Le principe reste sensiblement le même ; mais ici, le papier est coupé au-dessous de la tache de diglucosides, et les deux solvants agissent dans la même direction.

Les résultats sont comparables aux précédents.

c) Chromatographie en surdéveloppement :

Il s'agit seulement d'une prolongation du temps de développement, comme cela a été indiqué à propos de la chromatographie ascendante unidimensionnelle.

Cette technique est valable avec tous les solvants retenus.

IV. — COMPARAISON DES TECHNIQUES FRANÇAISES ET ALLEMANDES

A — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

1 — *Technique française* (JAULMES-NEY. 1960).

L'essai a été réalisé selon la méthode proposée par les auteurs comme méthode nationale. (Ann. Fals. Fraudes, Avril 1960).

2 — *Techniques allemandes.*

Le Butanol-chlorhydrique de BIEBER a été utilisé selon la technique française en le substituant au tampon de BRITTON, et sans concentration des matières colorantes. La première constatation est que, dans les mêmes conditions, le temps de

développement est 5 fois plus grand qu'avec le tampon de BRITTON. Par contre, si la surface de la tache du diglucoside malvoside est 3 à 4 fois plus faible qu'avec le tampon de BRITTON, l'intensité de la fluorescence peut être évaluée à 6 ou 7 fois celle obtenue avec le solvant de comparaison. Ce dernier point présente un réel intérêt ; mais les laboratoires allemands ont abandonné ce bon solvant au profit du butanol-acétique et du solvant acide acétique-acide chlorhydrique, qui sont utilisés dans les techniques DIEMAIR-SENCEWALD d'origine et modifiée par BIEBER : la chromatographie est conduite selon la méthode circulaire, sur des vins qui doivent être purifiés et concentrés, les deux solvants étant peu révélateurs.

La comparaison des techniques allemandes à la méthode française a été réalisée de deux façons :

- d'une part, en suivant scrupuleusement les indications fournies par leurs auteurs,
- d'autre part, en rendant identiques toutes les conditions de base : même quantité de vin, non concentré, déposée par cm de tache de départ.

B — RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Le procédé allemand exige une concentration des vins et un développement en chromatographie circulaire. Il en résulte, d'une part, un certain encombrement de l'appareillage, d'autre part, une limitation du nombre des échantillons examinés : tout au plus l'opérateur pourra-t-il, dans les meilleures conditions, préparer et examiner quelques vins par jour.

La technique française (vins non concentrés), en revanche, permet de réaliser un nombre important d'essais dans le même temps.

En outre, la qualité de la fluorescence est plutôt inférieure à celle obtenue par la technique française ; en effet, l'action satisfaisante de la concentration est annulée par la mauvaise qualité révélatrice des solvants, et par l'étalement des taches dû au développement circulaire.

Enfin, si la comparaison à la technique française se fait à partir de vins non concentrés, on ne peut que contester la valeur de la méthode allemande.

En définitive, à égalité de révélation, la méthode française est nettement supérieure, car elle permet un travail rapide, commode et moins onéreux.

Si une technique internationale devait s'imposer, il semble que la méthode française de développement serait préférable, tout en adoptant, dans le cas de vins sucrés, la purification des matières colorantes selon DIEMAIR-SENCEWALD et BIEBER, et en employant comme solvant le butanol chlorhydrique de BIEBER.

V. — PHOTOGRAPHIE EN LUMIÈRE ULTRA-VIOLETTE

L'appareil qui a servi aux différents essais photographiques est de format 24×36 , à visée reflexe.

A — PHOTOGRAPHIE EN NOIR

Ce genre de photographie donne des résultats intéressants, surtout dans le cas d'une assez forte proportion de vin d'hybride. Cela n'est toutefois valable que si un commentaire indique les places respectives des divers colorants. De

toute manière, il ne serait guère possible d'utiliser ce type de photographie en expertise.

Deux sortes d'essais ont été réalisés :

1^o — Prise de vue sans filtre coloré.

Seul un filtre anti-U.V. incolore est placé devant l'objectif. La lampe à U.V. éclaire le chromatogramme disposé sur fond noir mat (fig. 2). Les temps de pose s'échelonnent de 1/2 seconde à 5 minutes.

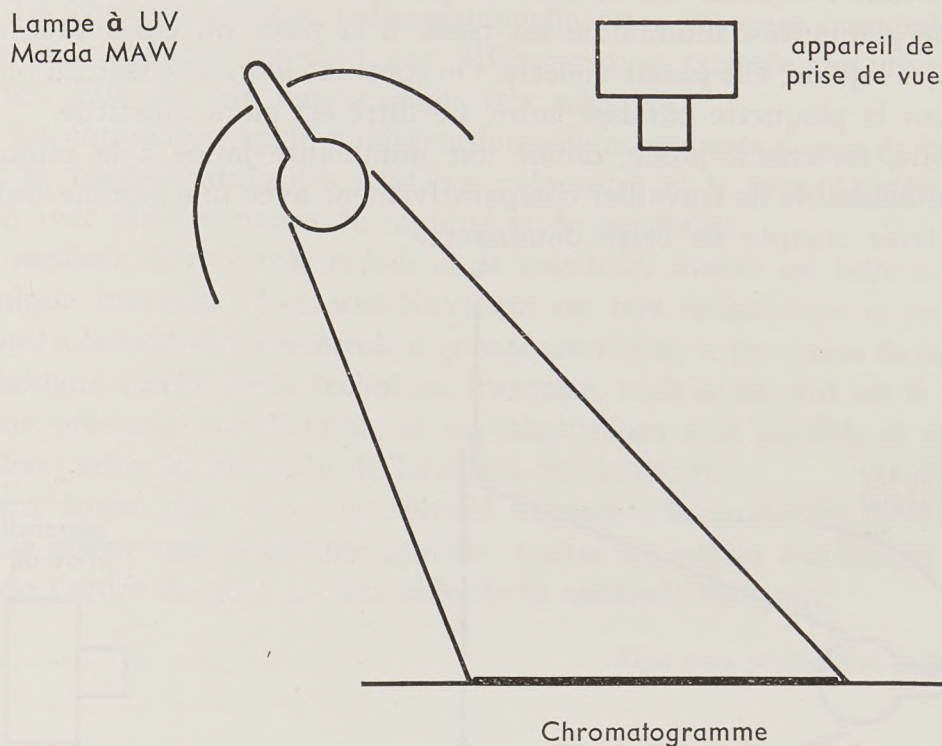


FIG. 2.

Les résultats sont pratiquement nuls.

2^o — Prise de vue avec filtres colorés (en plus du filtre anti-U.V.)

+ filtre jaune : résultats peu intéressants.

+ filtre orange : les fluorescences rouges ont impressionné le film. Les résultats sont assez bons, car les diverses couleurs sont différenciées. La pose de 2 minutes s'est révélée la meilleure.

+ filtre rouge moyen : ce filtre a pour but d'éliminer les taches de monoglucosides, et de ne conserver que les taches de diglucosides qui ressortent en blanc sur fond presque noir. Les résultats sont bons, car une tache de diglucosides provenant de 1 p. 100 d'*Oberlin* est nettement visible. Ici, les temps de pose sont échelonnés de 2 à 10 minutes. Cependant, il conviendrait de prendre le temps le plus réduit, car l'exposition des chromatogrammes sous lumière ultra-violette, au-delà de 5 minutes, crée des fluorescences parasites qui impressionnent le film et faussent les résultats.

B — PHOTOGRAPHIE EN COULEUR

Une photographie en couleur ou sa diapositive représentera beaucoup plus fidèlement le chromatogramme. Aussi l'expérimentation a-t-elle été faite sur pellicule Ektachrome HS — 160^o ASA.

Un premier essai, sans filtre coloré, et avec des temps de pose échelonnés de 1/8 de seconde à 10 minutes, n'a donné aucun résultat valable.

Une autre série d'essais a donc été réalisée avec des filtres colorés.

Le premier type de filtre employé est un filtre liquide que l'utilisateur compose avant les prises de vue : c'est essentiellement une solution de nitrite de sodium à 5 p. 100 qui est teintée progressivement avec une solution saturée de bichromate de potassium. Ce liquide est versé dans une boîte de Pétri, placée sur un support circulaire, devant l'objectif. On se met en position de prise de vue, lampe U.V. allumée. Une plaquette d'aluminium est posée à la place du chromatogramme. A travers le filtre liquide, elle paraît violette. On continue alors à verser du bichromate jusqu'à ce que la plaquette paraisse noire. Le filtre est alors constitué.

Le liquide, fortement jaune, donne une dominante jaune à la photographie. Il est donc souhaitable de travailler comparativement avec une gamme étalon d'hybride pour tenir compte de cette dominante.

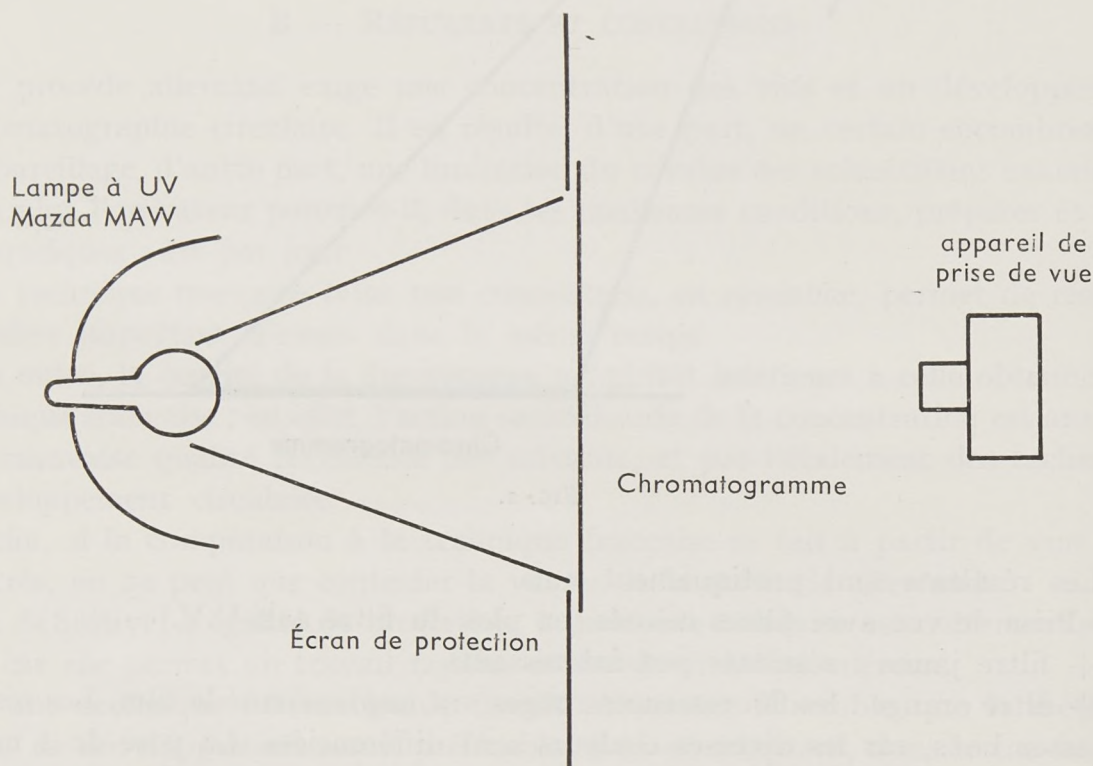


FIG. 3.

Les temps de pose se situent de 2 à 6 minutes. La sensibilité est bonne puisqu'un taux de 1 p. 100 d'*Oberlin* dans le vin est discernable.

Le système semble valable, d'autant plus que les déformations dues au fond irrégulier de la boîte de Pétri peuvent être supprimées par l'emploi d'une petite cuve à fond parfaitement plat.

La technique décrite par RENTSCHLER H. (1959) (fig. 3), donne également de très bons résultats. Elle consiste à photographier le chromatogramme par transparence. Un filtre jaune moyen est posé sur le filtre incolore anti-U.V. Le rendu des couleurs, qui ressortent sur un fond gris verdâtre, est très satisfaisant.

Les résultats étant convenables, il n'a pas été procédé à l'essai d'émulsions sensibles aux infra-rouges.

VI. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES : CHOIX DES MÉTHODES

De l'expérimentation des trois principaux types de chromatographie, résultent les conclusions générales suivantes :

— La chromatographie circulaire est à déconseiller pour le genre de recherche envisagée.

— La chromatographie bidimensionnelle est à réserver essentiellement à des travaux de recherche exigeant une différenciation poussée des diverses matières colorantes. Elle est très longue, mais très sélective.

— La chromatographie unidimensionnelle ascendante donne de bons résultats. Suivant la concentration des matières colorantes et le type de solvant, elle sera conduite avec plus ou moins de rapidité et de sensibilité.

La méthode de recherche rapide et de sensibilité limitée est celle faisant appel à la technique française (JAULMES-NEY) qui est très économique et pratique.

Quant à la méthode de recherche à grande sensibilité, le processus de développement reste analogue à celui de la technique française, mais le solvant est le butanol-chlorhydrique préconisé par BIEBER, et les échantillons sont purifiés et concentrés (de 5 à 10 fois) selon la méthode de DIEMAIR-SENCEWALD.

Étant donné que ce dernier solvant augmente la sensibilité de 6 à 7 fois, cette technique donne une sensibilité globale, toutes les autres conditions restant identiques, de l'ordre de 30 à 40 fois celle de la méthode française.

Reçu pour publication en juillet 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIEBER H., 1960. Der papierchromatographische Nachweis von rotem Hybridenfarbstoff. *Wein und Rebe*, 21.
- BIOL H., MICHEL A., 1961. Chromatographie sur papier des matières colorantes des vins rouges. *Ann. Technol. agric* (sous presse).
- HARBORNE J. B., 1958. Identification chromatographique des pigments anthocyaniques. *Chromatogr.*, 473.
- JAULMES et NEY, 1960. Recherche des vins d'hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Fals. Fraudes*, N° 616, 180-183.
- MARICHAL M., 1956. Caractérisation des vins issus d'hybrides producteurs directs par chromatographie simplifiée. *Ann. Fals. Fraudes*, N° 568, 155-159.
- PARIS R. et Melle ROUSSELET R., 1958. Caractérisation des colorants d'origine végétale à l'aide de la chromatographie sur papier. *Ann. Pharm. Franç.*, 16, 747-757.
- RENTSCHLER H., 1959. Nachweis von hybridenwein im Wein aus Vinifera-Reben. *Trav. Chim. Alim. Hyg.*, 50, 533-540.

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES VINS ROUGES ISSUS DE CÉPAGES RÉGLEMENTÉS

H. BIOL et A. MICHEL

Station œnologique, Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, Beaune.

SOMMAIRE

L'encépagement du vignoble français est réglementé. La majeure partie des cépages qui y sont cultivés sont des *Vitis vinifera*, mais la réglementation admet un certain nombre d'hybrides franco-américains.

Les Auteurs ont voulu vérifier si, parmi les cépages réglementés, il en existe qui présentent la réaction chromatographique du diglucoside malvoside (malvine).

En conséquence de cette enquête, ils concluent à l'absence de cette anthocyane dans tous les vins issus de *V. vinifera* et également dans certains hybrides classés ou en expérimentation.

I. — INTRODUCTION

Trois réglementations régissent l'encépagement du vignoble français.

La plus ancienne, née en 1935, a été établie par l'Institut national des Appellations d'Origine des Vins et Eaux-de-Vie. Les cépages dont les vins bénéficient d'une appellation d'origine (A. O. C.), sont précisés dans le décret de contrôle intéressant chaque appellation. Tous ces cépages sont des *Vitis vinifera*.

Les vins délimités de qualité supérieure (V. D. Q. S.), de création récente, sont issus de *V. vinifera* et la nomenclature des cépages est également fixée par décret.

Enfin, les vins de consommation courante (V. C. C.) issus de tous cépages (*V. vinifera* et hybrides) ont été réglementés par l'Institut des Vins de Consommation courante qui les a classés en quatre catégories : cépages recommandés, autorisés, tolérés et interdits. Après consultation auprès des Commissions compétentes régionales, l'I. V. C. C. a établi une liste limitative qui comporte les cépages produisant les vins les meilleurs.

Le présent travail a pour but de déterminer si les cépages classés suivant ces trois réglementations (à l'exception des cépages tolérés et interdits) et en expérimentation, présentent ou non la réaction chromatographique du diglucoside malvoside

et, plus particulièrement, si cette anthocyane est absente dans tous les vins issus de *V. vinifera*.

II. — ORIGINE ET CHOIX DES CÉPAGES — VINIFICATION

Les cépages à étudier ont été identifiés et collectés en 1960 par des ampélographes compétents dans les collections de la Grande Ferrade (INRA) et de Vassal (ENAM) ainsi que dans les principales régions viticoles (Anjou, Vallée du Rhône, Bourgogne, Jura, etc.).

Chaque échantillon, d'un poids de 5 à 10 kg, a été cueilli à maturité et transporté dans des récipients étanches en matière plastique de qualité alimentaire du type bidon à lait d'une capacité de 10 litres.

Les raisins sains ont été logés avec soin dans chaque bidon afin d'éviter leur écrasement, et, conséquemment, toute fermentation du moût avant leur arrivée à destination. Pour limiter ce risque, il a été versé 10 ml de solution sulfureuse à 5 p. 100 par récipient, soit 5 à 10 g/hl de SO_2 .

Dès leur arrivée, les raisins ont été foulés et les récipients placés en chambre chaude à 25°C.

Les vinifications ont été conduites dans les récipients d'origine afin d'éviter toute manipulation qui risquait de souiller la pureté des raisins de chaque cépage identifié.

La technique de vinification a été celle préconisée par le Comité d'expérimentation de l'I. V. C. C.

Les fermentations terminées, chaque vin unifié a été mis en bouteilles et placé au réfrigérateur. Après clarification, le vin des bouteilles d'un même lot a été décanté, unifié, sulfité à 50 mg/l pour éviter toute oxydation et stabilisé au benzoate de soude à la dose de 1 g/l après s'être assuré que cet antiseptique n'avait aucune influence sur la qualité des chromatogrammes des matières colorantes. Finalement, les bouteilles ont été bouchées pleines et conservées couchées en cave.

III. — TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

En conclusion d'un précédent travail (BIOL H. et MICHEL A., 1961), les auteurs ont utilisés les méthodes et solvants retenus, soit :

En chromatographie ascendante unidimensionnelle :

— Butanol-acide chlorhydrique de BIEBER.

— Tampon de BRITTON-ROBINSON.

— Tampon phosphato-phosphorique.

En chromatographie ascendante bidimensionnelle :

— Butanol-acétique de P. RIBERAU-GAYON.

Les chromatogrammes ont été examinés en lumière U. V. en faisant appel aux deux lampes retenues : Mazda 125 MAW et Mineralight 253,7 m. mu.

IV. — RÉSULTATS

Dans le tableau 1 sont relevés les résultats de l'examen de tous les vins issus des cépages de *V. vinifera*. Le tableau 2 mentionne les résultats de l'examen des vins d'hybrides classés par l'I. V. C. C. ou en expérimentation.

Recherche du diglucoside malvoside par chromatographie ascendante unidimensionnelle sous lumière U. V. (253,7 m. mu) et lampe Mazda MAW

<i>Vitis vinifera</i>		Solvants utilisés		
Nom du cépage	Synonymes	Tampon de Britton-Robinson	Tampon Phosphato-phosphorique pH = 3,2-3,4	Butanol HCl
Alicante H. Bouschet .		A	A	A
A. de Lavallée		A	A	A
Aramon noir.....		A	A	A
Aspiran noir		A	A	A
Aubun	Counoise	A	A	A
Bachet		A	A	A
Barbaroux		A	A	A
Beaujolais	Abouriou	A	A	A
Bouchalès	Grappu, Prolongeau	A	A	A
Cabernet franc	Arrouya, Bouchy, Breton	A	A	A
Cabernet Sauvignon ..	Bouchet	A	A	A
Calitor	Pécoui-Touar, Braquet	A	A	A
Cardinal		A	A	A
Carignan noir		A	A	A
Castet.....		A	A	A
César	Romain	A	A	A
Cinsaut		A	A	A
Corbesse (de Savoie)..		A	A	A
Corbesse (Ardèche) ...	Chatus	A	A	A
Cot	Malbec, Cahors, Pressac	A	A	A
Duras		A	A	A
Durif		A	A	A
Étraire de l'Adui		A	A	A
Fer Servadou		A	A	A
Fer Béquignol	Chalosse noire	A	A	A
Folle Noire		A	A	A
Fuella néra		A	A	A
Gamay à jus blanc...	du Beaujolais	A	A	A
» de Bouze.....		A	A	A
» de Chaudenay.		A	A	A
» Castille		A	A	A
» Fréaux Hâtif .		A	A	A
» Fréaux ordi-		A	A	A
» naire		A	A	A
Gascon		A	A	A
Gougenot		A	A	A
Gouget		A	A	A
Gouni	Plant de Céas	A	A	A
Grassen		A	A	A
Grenache gris		A	A	A
» noir		A	A	A
Gris meunier	Meunier	A	A	A
Grolleau	Groslo	A	A	A
Joubertin.....		A	A	A
Jurançon noir		A	A	A
Mancin de Corrèze ...		A	A	A
Mauzac rose		A	A	A
Manseng noir		A	A	A
Menseng rouge		A	A	A
Mérille		A	A	A
Merlot noir		A	A	A

*Recherche du diglucoside malvoside par chromatographie ascendante
unidimensionnelle sous lumière U. V. (253,7 m. mu) et lampe Mazda MAW
(suite)*

<i>Vitis vinifera</i>		Solvants utilisés		
Nom du cépage	Synonymes	Tampon de Britton- Robinson	Tampon Phosphato- phosphorique pH = 3,2-3,4	Butanol HCl
Mollard	Petit Brun	A	A	A
Mondeuse	Milgranet, Molette noire	A	A	A
Morastel à jus blanc.		A	A	A
Mourvaison		A	A	A
Mourvèdre	Balzac noir	A	A	A
Mouyssaguès		A	A	A
Muscat rouge à petits grains	(Madère?) (INAO)	A	A	A
Muscat de Hambourg.		A	A	A
Nègrette	Dégoutant	A	A	A
Niellucio		A	A	A
Noir fleurien		A	A	A
Olivette noire		A	A	A
Œillade		A	A	A
Persan		A	A	A
Pignon	Petit noir, Pardotte	A	A	A
Pinot d'Aunis	Pineau d'Aunis	A	A	A
Pinot gris	Pinot Beurot	A	A	A
Pinot Meunier		A	A	A
Pinot Mourot	Tête de Nègre	A	A	A
Pinot teinturier		A	A	A
Pinot noir fin		A	A	A
Pinot Liebault		A	A	A
Pinot Renevey		A	A	A
Pinot droit	ou érigé	A	A	A
Piquepoul noir	ou rouge	A	A	A
Plant droit		A	A	A
Plant du Four	Téoulrier, Manosquin	A	A	A
Poulsard		A	A	A
Portugais bleu		A	A	A
Prunelard	Cinsaut (?)	A	A	A
Saint-Macaire	Moustouzère, Courbu	A	A	A
Sciacarello		A	A	A
Servanin		A	A	A
Syrah		A	A	A
Tannat		A	A	A
Terret gris		A	A	A
» noir		A	A	A
Tibourenc		A	A	A
Toustain	Plant romain	A	A	A
Tressot		A	A	A
Trousseau		A	A	A
Vaccarèse		A	A	A
Valdigué		A	A	A
Verdot colon	Fer Servadou	A	A	A
Verdot gros	» »	A	A	A
Verdot petit	» »	A	A	A

Recherche du diglucoside malvoside par chromatographie ascendante unidimensionnelle sous lumière U. V. (253,7 m. mu) et lampe Mazda MAW

Hybrides	Solvants utilisés		
	Tampon de Britton- Robinson	Tampon Phosphato- phosphorique pH = 3,2-3,4	Butanol HCl
Baco N° 1.....	P	P	P
Burdin 7 705.....	A	A	A
Castel 19 637	P	P	P
Couderc 7 120.....	P	P	P
Kulhmann 188-2	P	P	P
Kulhmann 192-2	P	P	P
Kulhmann 143-3	P	P	P
Landot 244	A	A	A
Oberlin 595	P	P	P
Seibel 1 000	P	P	P
» 5 455	A	A	A
» 7 053	P	P	P
» 8 357	P	P	P
» 8 365	P	P	P
» 8 745	P	P	P
» 8 748	P	P	P
» 10 878	A	A	A
» 11 803	A	A	A
» 13 053	P	P	P
» 13 666	P	P	P
Seyve-Villard 18 283	P	P	P
» » 18 315	P	P	P
» » 23 657	P	P	P

A noter que la chromatographie ascendante bidimensionnelle a été appliquée aux seuls cépages suivants :

V. vinifera :

Pinot à jus blanc,
Cabernet-Sauvignon,
Aramon à jus blanc.

Teinturiers :

Alicante H. Bouschet,
Gamay Fréaux Ordinaire,
Gamay Castille.

Hybrides franco-américains sans malvine :

Burdin 7705,
Seibel 5455,
Landot 244,

et que leur examen n'a révélé aucune différenciation caractéristique entre ces trois types de cépages.

V. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De cette étude, il ressort que :

1^o Tous les cépages réglementés de *V. vinifera* (96 échantillons) sont exempts de diglucoside malvoside.

2^o Parmi les cépages hybrides réglementés ou en expérimentation, 18 contiennent du diglucoside malvoside, alors que 5 en sont dépourvus.

3^o La chromatographie ascendante bidimensionnelle ne permet pas, dans l'état actuel de nos connaissances, de différencier les hybrides sans malvine des *V. vinifera* à jus blanc et à jus rouge. (teinturiers).

REMERCIEMENTS

Cette enquête, importante par ses conséquences, n'a pu être menée à bien que grâce à l'amabilité de Monsieur l'Inspecteur Général BUSTARRET et de Monsieur le Directeur Central FLANZY qui nous ont fourni les moyens matériels indispensables à sa réalisation,

à M. le P^r BRANAS qui a mis la collection de Vassal à notre disposition,

à M. TRUEL, responsable du Domaine de Vassal,

à M. LEVADOUX, responsable de la collection de la Grande -Ferrade et à M. RIVES, du Centre de Recherches agronomiques du Sud-Ouest,

à M. GUILLOT, Inspecteur Principal, à MM. BERNARD et VALLAT et autres Chefs de Centre de l'I. V. C. C. qui ont identifié et collecté les cépages et sans lesquels aucun travail sérieux n'aurait pu être envisagé,

à l'Institut technique du Vin, qui a bien voulu prendre en charge tous les frais occasionnés pour la réalisation de ce travail,

à MM. les Directeurs de l'I. V. C. C. de l'I. N. A. O. et de l'O. I. V. qui nous ont dit tout l'intérêt qu'ils portaient à cette enquête.

Enfin, nous ne saurions manquer de rappeler combien nous sommes reconnaissants à M. FOU-
LONNEAU, Ingénieur Agricole, Conseiller Technique de l'I.T.V. pour la collaboration qu'il a apportée à la réalisation du travail chromatographique.

Reçu pour publication en juillet 1961.

LE PAEONIDOL 3.5 DIGLUCOSIDE DANS LE GENRE VITIS

H. BIOL et C. FOULONNEAU

Station œnologique, Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, Beaune.

SOMMAIRE

Au cours d'une étude sur les matières colorantes des vins rouges par la méthode chromatographique bidimensionnelle de partage sur papier, les Auteurs ont observé, sous lumière U. V., la présence de paeonidol 3.5 diglucoside (paeonine) dans les vins de *Vitis vinifera*, de ses métis et de ses hybrides.

Sur 11 vins examinés, tous révélaient cette tache. Par contre, le malvidol 3.5 diglucoside (malvine) était absent dans tous les vins issus de *V. vinifera* et ses métis, de même que dans certains hybrides.

Accessoirement, il a été décelé sur 5 d'entre eux, la présence d'une anthocyane pouvant être identifiée à un diglucoside acylé.

Les mêmes vins examinés en chromatographie unidimensionnelle ne laissent pas apparaître la paeonine. Celle-ci n'existe qu'à l'état de traces masquées par les traînées d'autres matières colorantes.

INTRODUCTION

Dans un travail précédent, BIOL H. et MICHEL A. ont constaté sur des chromatogrammes bidimensionnels préparés en partant de vins issus de *V. vinifera*, la présence d'une fluorescence non identifiée que certains auteurs attribuent à la malvine. Or, selon P. RIBÉREAU-GAYON (1959-1960), ce diglucoside est inexistant dans les pellicules des fruits de ces cépages. Aussi se sont-ils attachés à l'identification de cette fluorescence controversée.

En chromatographie bidimensionnelle, il apparaît, sous lumière U.V., une tache de teinte rappelant le rouge brique du diglucoside malvoside et, lorsque ce dernier est présent, les deux taches se superposent partiellement.

Si l'on se réfère à la thèse de P. RIBÉREAU-GAYON, et compte-tenu de ce que les colorations roses sous U.V. sont des 3.5 diglucosides de constitution très voisine du malvoside, un rapprochement laisse supposer, d'après l'emplacement des taches bidimensionnelles observées, qu'il devrait s'agir du paeonidol 3.5 diglucoside signalé inexistant dans les produits de *V. vinifera*.

Telle est l'hypothèse que les auteurs ont essayé de confirmer.

TECHNIQUES OPÉRATOIRES

Substances de référence

La *malvine*, d'origine allemande, est une solution à 10 mg. dans 100 ml. HCl à 1 p. cent. Par chromatographie à une et à deux dimensions il a été vérifié qu'il s'agissait bien d'un colorant unique ne présentant aucune impureté parasite.

La *paeonine* est extraite de la pivoine rouge (*Paeonia*) (GRIGNARD V., 1945. FOUASSIN A., 1956). A cet effet, les pétales de pivoine sont malaxés dans un mélange de HCl N et de méthanol (2 v-3 v) en utilisant aussi peu de liquide que possible. Le magma est enfin centrifugé durant 5 minutes à 4 mille t./m. Le liquide surnageant décanté a servi de colorant de référence.

La solution obtenue a été examinée en chromatographie ascendante unidimensionnelle en utilisant comparativement comme solvants, butanol-HCl, Britton-Robinson et, en bidimensionnelle, butanol-acétique.

Dans ces conditions expérimentales, il a toujours été obtenu deux taches ; l'une de teinte orangée à rouge brique selon la nature du solvant, et l'autre violet-bleu, plus ou moins étalée, correspondant à la cyanidine. Cette dernière est invisible en lumière blanche et à peine perceptible sous la lumière U. V. de la lampe Mazda MAW 125. Par contre, cette tache ressort intensément avec la lampe Mineralight de 253,7 m μ de longueur d'onde. En chromatographie bidimensionnelle, la cyanidine présente une tache nettement séparée de la paeonine et ne gêne en rien la suite de l'étude sur ce dernier colorant. (fig. 1).

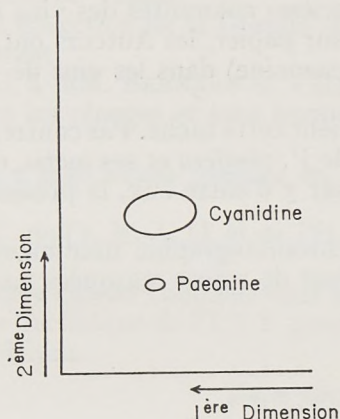


FIG. 1

Comparaison et différenciation malvine-paeonine.

Avec les solvants unidimensionnels, les résultats suivants ont été relevés :

Britton-Robinson : les deux colorants présentent sensiblement le même R_f.

Butanol-HCl : les deux colorants sont nettement séparés, la paeonine étant plus entraînée que la malvine.

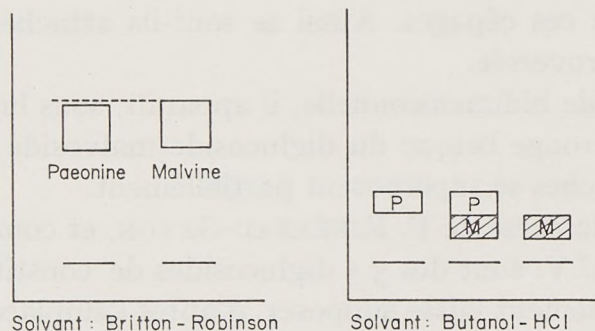


FIG. 2

Dans les deux cas, la paeonine est orangée alors que la malvine est plus rouge (fig. 2).

En développement bidimensionnel (butanol-acétique), les deux anthocyanes restent accolées tout en présentant des colorations différentes, la paeonine se trouvant placée à droite et au-dessus de la malvine (fig. 3).

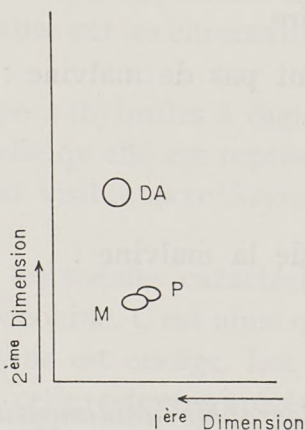


FIG. 3

Soumise aux vapeurs chlorhydriques, la tache de paeonine vire à l'orange puis au jaune et peut même disparaître si son intensité est faible. Dans les mêmes conditions, la tache de malvine vire au rouge brique intense.

Sous l'effet de vapeurs ammoniacales, la paeonine devient rouge cerise, alors que la tache de malvine vire au violet en s'estompant et peut même disparaître si son intensité est très faible.

Par actions alternées et multiples de HCl et NH³, les variations de coloration sont reproductibles, ce qui prouverait la stabilité des deux diglucosides, et éliminerait ainsi l'hypothèse selon laquelle ceux-ci pourraient être hydrolysés en milieu fortement acide ou basique, dans les conditions précitées.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les matières colorantes des vins étudiés ont été purifiées et concentrées selon la technique de DIEMAIR-SENCEWALD (methode officielle allemande). Le produit final destiné à l'examen chromatographique a été ainsi concentré six fois. Celui-ci a été appliqué en développements ascendants uni et bidimensionnel.

Dans le cas premier, les solvants de Britton-Robinson et butanol-HCl ont été employés en utilisant le papier Schleicher et Schull 2043, à la température de 20°C. Le temps de développement a été de 15 heures, ce qui crée un surdéveloppement favorisant la séparation des taches et leur identification. Les témoins de référence sont la malvine et la paeonine précitées.

En développement bidimensionnel, il a été utilisé le butanol-acétique, et les chromatogrammes ont été réalisés suivant les mêmes données qu'en unidimensionnel, mais les papiers mesurant 25 × 25. Les temps de développement ont été de 15 heures pour la première dimension et de 24 ou 48 heures pour la seconde.

Types de vins examinés

I. — *V. vinifera* à jus blanc :

Pinot de Bourgogne.

Aramon.

Cabernet-Sauvignon.

2. — *V. vinifera* à jus rouge :
Alicante H. Bouschet.
Gamay Castille.
Gamay Fréaux ordinaire.
3. — Hybrides ne contenant pas de malvine :
Landot 244.
Seibel 5455.
Seibel 10878.
4. — Hybrides contenant de la malvine :
Oberlin 595.
Seyve-Villard 18315.

Chromatographie unidimensionnelle

La chromatographie avec le solvant de Britton-Robinson amène les remarques suivantes :

Dans les types 1, 2 et 3, les vins ne renferment pas de malvine ni aucune anthocyanne pouvant prêter à confusion avec elle. Dans le cas de l'Alicante H. Bouschet, légèrement au-dessus de l'emplacement habituel de la malvine se situe une fluorescence bleue sous-jacente, qui avive la traînée violacée au sommet de son développement. Cette fluorescence, nettement visible avec la lampe Mazda, est à peine perceptible avec la lampe Mineralight. En utilisant cette dernière, le phénomène disparaît, ce qui fait penser que celui-ci serait imputable à la fluorescence bleue. Ces observations sont également valables pour des papiers de 45 cm. de développement et quelle que soit la durée de celui-ci.

Avec le butanol-HCl, aucune fluorescence parasite n'apparaît, que le vin soit ou non concentré.

Chromatographie bidimensionnelle

Les fluorescences des anthocyanes diglucosidiques peuvent être interprétées comme suit :

Sur les trois vins de *V. vinifera* à jus blanc (type 1), il a été observé une fluorescence rose située exactement à l'emplacement de la tache de paeonine (fig. 3).

Avec *Cabernet-Sauvignon*, on observe une seconde tache rose située en position DA (fig. 3) qui, selon P. RIBÉREAU-GAYON, serait un diglucoside acylé du malvidol ou du paeonidol.

Seule la première tache présente un intérêt, car elle est placée dans la zone malvine-paeonine.

Soumis aux mêmes réactions alcaline et acide par émission de vapeurs chlorhydriques ou ammoniacales, les chromatogrammes des trois vins du type 1 ont réagi de façons identiques à celles observées avec la paeonine sans que ces réactions puissent prêter à confusion avec la malvine hypothétique.

Les trois vins issus de *V. vinifera* à jus rouge (type 2) présentent des chromatogrammes dont les taches sont disposées selon le schéma du *Cabernet-Sauvignon*, à savoir : deux taches fluorescentes roses. Les réactions aux vapeurs HCl et NH³ ont donné les mêmes résultats que ceux observés précédemment. En conséquence, ces

taches sont bien celles de la paeonine ou paeonidol 3.5 diglucoside et non celles de la malvine.

Avec les vins du type 3, la même disposition des taches et les mêmes réactions acide ou basique que celles obtenues sur les chromatogrammes des types 1 et 2 ont été observées.

Enfin, avec les vins du type 4 (hybrides à diglucoside malvoside) on constate la double tache (taches accolées) telle qu'elle est représentée sur le schéma de la fig. 3. Par contre, la tache DA qui est visible avec *Seyve-Villard 18315*, fait défaut sur *Oberlin 595*.

La double tache présente les mêmes caractéristiques que celles observées en partant de la malvine et de la paeonine. C'est ainsi que la tache de malvine est rouge cerise et celle accolée à la malvine est orange. Les réactions aux vapeurs acides et ammoniacales sont identiques à celles relevées précédemment. Aussi peut-on conclure que les deux taches accolées se différencient d'une façon indiscutable.

Cas particulier de l'Alicante H. Bouschet

L'Alicante H. Bouschet a été choisi comme test, car son vin est le plus riche en l'anthocyane à identifier par chromatographie bidimensionnelle (DEIBNER L., 1957, et DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960).

A cet effet les chromatogrammes suivants ont été réalisés :

1. *Alicante H. B.* témoin
2. *Alicante H. B.* + malvine
3. *Alicante H. B.* + paeonine
4. *Alicante H. B.* + malvine + paeonine

L'observation de ces chromatogrammes amène les remarques ci-après :

- a) *L'Alicante H. B.* a toujours sa tache fluorescente orange,
- b) *l'Alicante H. B.* + malvine a la double tache accolée rouge et orange,
- c) *l'Alicante H. B.* + paeonine n'a qu'une seule tache orange,
- d) *l'Alicante H. B.* + malvine + paeonine a la double tache accolée,
- e) les réactions aux vapeurs acides et ammoniacales sont identiques à celles relevées précédemment.

En conclusion, on peut affirmer que *l'Alicante H. Bouschet* ne renferme pas de malvidol 3.5 diglucoside.

CONCLUSIONS

Les chromatogrammes bidimensionnels des anthocyanes de référence, malvine et paeonine, confirment les résultats rapportés par P. RIBÉREAU-GAYON quant à la position accolée de ces deux 3.5 diglucosides.

Les réactions colorées de la malvine et de la paeonine aux vapeurs chlorhydriques et ammoniacales permettent leur différenciation.

Les vins rouges expérimentés sont classés en quatre types : *V. vinifera* à jus blanc, *V. vinifera* à jus rouge, hybrides dépourvus de malvine et hybrides riches en malvine. Leurs matières colorantes, purifiées et concentrées, ont été examinées

en chromatographie bidimensionnelle. Elles présentent toutes une fluorescence rose située à l'emplacement de la paeonine de référence.

Les essais d'adjonction de malvine et de paeonine dans un vin-test de *V. vinifera* portent à conclure que l'anthocyane à identifier est bien le paeonidol 3.5 diglucoside et confirment que les vins issus de *V. vinifera* et ses métis sont dépourvus de malvidol 3.5 diglucoside. Mais la paeonine échappe à la lecture des chromatogrammes unidimensionnels préparés en partant directement de vins originaux.

Parmi les vins examinés (dont certains de *V. vinifera*), il en est qui ont une autre fluorescence rose pouvant être identifiée à un diglucoside acylé.

Reçu pour publication en juin 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIOL H., MICHEL A., 1961. Recherche sur les matières colorantes des vins rouges (en cours de publication). *Ann. Technol. Agric.*
- DEIBNER L., 1957. Systèmes oxydo-réducteurs et potentiel du vin. *Rev. Ferm. & Industr. Alim.*, **12**, 231-254.
- DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960. Sur les incertitudes dans la différenciation des cépages *Vitis vinifera* et hybrides rouges par chromatographie sur papier de leurs substances colorantes. *C. R. Acad. Agric.*, **46**, 968.
- FOUASSIN A., 1956. Identification par chromatographie des pigments anthocyaniques des fruits et des légumes. *Revue. Ferm. & Industr. Alim.*, **11**, 173-192.
- GRIGNARD V., 1945. *Traité de Chimie Organique*. **18**, 504. Masson Ed. Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. Thèse Doc. ès Sci, Edit. Librairie générale de l'Enseignement. Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1960. Les anthocyanes du genre *Vitis*. Application à la différenciation des vins. *C. R. Acad. Sci.*, 250-591.

ETUDE D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DU POTASSIUM PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE DE FLAMME DANS LES VINS ET LES MOUTS

C. JOURET et C. POUX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne.

SOMMAIRE

La spectrophotométrie de flamme offre pour le dosage du potassium dans les moûts et les vins l'avantage de sa rapidité. Toutefois, le mode opératoire dépend de l'appareillage utilisé, et nécessite une mise au point préliminaire.

Dans cette étude les conditions de travail ont été précisées avec l'appareil JOBIN et YVON, type « Algérie ». Après des essais comparatifs entre la mesure directe sur la dilution des vins et sur leurs cendres, et une étude de l'interférence des différents cations et anions, on peut penser que par simple dilution du vin au 1/25 ou au 1/50, on peut obtenir rapidement une estimation du potassium à ± 3 p. 100 dans le cas général des vins et ± 5 p. 100 dans des cas défavorables.

I. — INTRODUCTION

La technique de dosage du potassium par spectrophotométrie de flamme a fait l'objet durant ces dernières années de nombreuses applications dans les liquides biologiques.

BONASTRE (1955) a décrit et adapté un appareillage dans le cas des vins.

Toutefois, (GUEGEN et ROMBAUTS, 1961), le mode opératoire dépendant essentiellement du type d'appareil, nous avons été amenés à préciser la technique opératoire avec l'appareil que nous avons utilisé.

II. — APPAREILLAGE

L'appareil utilisé est l'ensemble : dispositif de flamme, spectrophotomètre électronique, type « Algérie », construit par les Ets JOBIN et YVON. Le brûleur est alimenté par un mélange d'oxygène et d'acétylène sous une pression de fonctionnement de 1, 100 Kg pour l'oxygène et de 0, 100 Kg pour l'acétylène.

On utilise la cellule photoélectrique au césium qui est sensible à la longueur d'onde de 769 m μ de la raie d'émission du potassium, choisie pour nos essais.

III. — ESSAIS

1° Courbe d'étalonnage

BONASTRE (1959) préconise un dosage spectrophotométrique direct du potassium dans les vins en diluant 10 fois l'échantillon à analyser.

A une telle dilution, la prise d'essai renferme en général de 2 à 4 méq K/l.

La courbe d'étalonnage est faite avec des solutions de chlorure de potassium.

Le 100 de transmission optique du galvanomètre est donné par une solution à 5 méq K/l. Dans ces conditions, la sensibilité du galvanomètre étant de 10μ A, la fente à 14/100 mm de large et 7/10 de mm de hauteur.

Le fond de flamme est d'une demi-division de l'échelle du galvanomètre.

K/méq/l.	p. 100 transmission
5	100
4	86
3	71
2,5	62
2	54
1,25	38
1	31
0,50	16

Ces chiffres ont servi à établir le graphique 1.

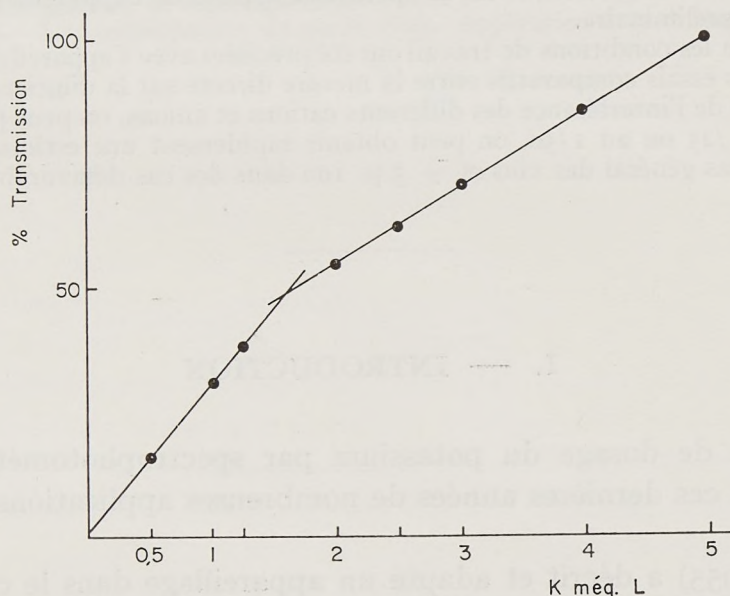


FIG. 1

Dans les conditions expérimentales utilisées, on note une cassure pour 1,60 méq de K/l. environ. De plus, on remarque que les points sont moins bien alignés pour une richesse supérieure à 1,60 méq K/l.

Pour avoir une courbe de référence représentée par une droite aussi parfaite que possible, le 100 de l'échelle du galvanomètre a été effectué à l'aide d'une solution à 1,25 méq K/l.

Pour rester dans les limites de cette nouvelle courbe d'étalonnage la dilution du vin passe à 1/25 ou 1/50 suivant la richesse initiale de l'échantillon.

En utilisant la sensibilité de 5μ A du galvanomètre les caractéristiques de la fente restent les mêmes que lors de l'essai précédent.

Le fond de flamme est toujours d'une demi-division de l'échelle du galvanomètre.

Solution de KCl en m $\acute{e}$ q K/l.

p. 100 transmission

1,25.....	100
1,00.....	81
0,80.....	66
0,60.....	51
0,50.....	42
0,40.....	34
0,20.....	18
0,10.....	10

Ces r $\acute{e}$ sultats ont servi $\grave{a}$ tracer le graphique 2. La droite obtenue est tr $\acute{e}$ s satisfaisante.

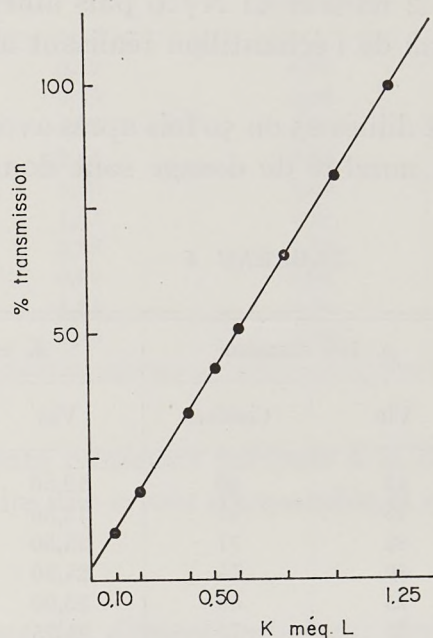


FIG. 2

2 $^{\circ}$ Erreur faite sur la lecture du galvanom $\acute{e}$ tre

10 solutions pures de KCl $\grave{a}$ 1 m $\acute{e}$ q K/l sont pr $\acute{e}$ par $\acute{e}$ es $\grave{a}$ partir de la m $\acute{e}$ me solution m $\acute{e}$ re $\grave{a}$ 5 m $\acute{e}$ q K/l.

3 mesures sont faites sur chacune de ces solutions.

Solution

p. 100 transmission

1	81 — 83 — 83
2	82 — 82 — 81
3	83 — 80 — 82
4	82 — 80 — 82
5	82 — 83 — 81
6	81 — 84 — 83
7	82 — 83 — 81
8	82 — 83 — 83
9	83 — 82 — 82
10	83 — 82 — 81

$$= \text{moyenne des mesures} = \frac{2\,642}{30} = 82$$

n = 30 mesures

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x')^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{27}{29}} \neq 1$$

$$= 82 \pm 1$$

Pour une solution de titre connu, le pourcentage de transmission est donné à une division près de l'échelle du galvanomètre ce qui se traduit sur la courbe par une erreur de 0,013 méq K/l.

3° Essais comparatifs du dosage du potassium sur un vin dilué et sur ses cendres

a) On a effectué les essais suivants :

— 10 ml de vin sont évaporés au bain-marie et calcinés à 525°C jusqu'à l'obtention de cendres blanches.

Celles-ci sont reprises par 2 ml d'H Cl N /10 puis amenées à 250 ml ou 500 ml suivant la richesse en potassium de l'échantillon réalisant ainsi une dilution au 1/25 et au 1/50 du vin initial.

— 10 ml du même vin sont dilués 25 ou 50 fois après avoir reçu 2 ml d'H Cl N /10.

Les résultats d'un certain nombre de dosage sont donnés au tableau n°1.

TABLEAU I

	Dilution	Échantillon	p. 100 transm.		K en méq./l		Différence Vins Cendres
			Vin	Cendres	Vin	Cendres	
Vins blancs	25	1	42	40	12,50	12,00	+ 4 %
—	—	2	45	44	13,50	13,25	+ 2 %
Vins rouges	—	3	83	77	25,50	24,00	+ 6 %
—	—	4	80	74	24,50	22,75	+ 7 %
—	—	5	75	69	23,00	21,25	+ 7 %
—	—	6	75	75	21,75	21,75	0
—	50	7	40	40	23,50	23,50	0
—	—	8	64	64	38,50	38,50	0
—	25	9	80	74	24,50	22,50	+ 9 %
—	—	10	81	83	25,00	25,25	— 1 %
—	50	11	63	56	38,00	34,00	+ 11 %
—	—	12	85	81	26,00	25,00	+ 4 %

Les différences sensibles enregistrées entre les vins et leurs cendres proviennent pour une grande part de pertes pendant la calcination et, d'autre part, de pertes par volatilisation.

Il n'est donc pas utile d'effectuer le dosage sur les cendres.

b) — Essais avec surcharge de potassium :

Afin de nous rendre compte de la précision du dosage, nous avons effectué sur des dilutions au 1/25 d'un certain nombre d'échantillons de vins et de leurs cendres, des dosages comparatifs avec une surcharge de 0,2 méq. de K par litre.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n°2.

Les additions de K effectuées sur les vins dilués ou sur les solutions de leurs cendres sont retrouvées d'une manière satisfaisante.

On peut estimer que par simple dilution du vin, on peut obtenir la valeur du potassium à ± 3 p.100 près.

Compte tenu de la remarque précédente que les cendres donnent le plus souvent des valeurs inférieures dues à des pertes de manipulation, on peut penser que les matières organiques du vin n'influent pas beaucoup sur le dosage dans les conditions expérimentales utilisées.

TABLEAU 2

Échantillons		K en méq./l			
		Vin au 1/25	Vin au 1/25 + 0,2 méq./l de K		Différence p. 100
			Théorique	Trouvé	
N ^o 1	{ Vin	0,79	0,99	0,99	0
	{ Cendres	0,79	0,99	0,98	— 1
N ^o 2	{ Vin	0,76	0,96	0,94	— 2
	{ Cendres	0,68	0,88	0,91	+ 3
N ^o 3	{ Vin	0,99	1,19	1,20	+ 1
	{ Cendres	1,01	1,21	1,20	— 1
N ^o 4	{ Vin	0,98	1,18	1,18	0
	{ Cendres	0,88	1,08	1,07	— 1
N ^o 5	{ Vin	1,04	1,24	1,27	+ 3
	{ Cendres	0,99	1,19	1,18	— 1

Toutefois, les éléments minéraux présents à la fois dans les vins et dans leurs cendres peuvent introduire une erreur comparable et on a essayé de se rendre compte de leur influence.

4° Interférence des éléments minéraux présents dans le vin

A — Cations :

Magnésium. — L'addition du Mg^{++} se fait à partir d'une solution de $Mg Cl_2$ à 528 mg./l. Les résultats sont rassemblés dans le tableau N° 3.

TABLEAU 3

Interférence du Mg dans le dosage de K

Quantité de K en méq./l.	Quantité de Mg ajouté en méq./l.	K apparent mesuré en méq./l.	Différence
1,00	0	1,00	0
1,00	0,27	1,00	0
1,00	0,54	1,01	+ 0,01
1,00	1,07	0,99	— 0,01

Malgré une addition de Mg^{++} dans une proportion inhabituelle dans un vin en comparaison des doses de K^+ , ce cation est sans action sur la mesure.

Calcium. — L'addition du Ca^{++} se fait à partir d'une solution de $Ca Cl_2, 4 H_2O$ à 152 méq./l. Le tableau N° 4 donne les résultats de ces essais.

TABLEAU 4

Interférences dues au Ca dans le dosage du K

Quantité de K en méq./l.	Quantité de Ca ajouté en méq./l.	K apparent mesuré en méq./l.
1,00	0	1,00
1,00	0,10	1,00
1,00	0,12	1,00
1,00	0,15	1,00
1,00	0,24	1,00
1,00	0,33	1,00
1,00	1,06	0,99

Pour les doses normales de Ca^{++} présentes dans le vin proportionnellement à celles de K, ce cation ne joue aucun rôle perturbateur sur la mesure.

Sodium. — L'addition de Na^+ se fait à partir d'une solution mère de NaCl à 5 méq Na/l.

Dans le tableau N° 5 on note que malgré des doses de Na beaucoup plus élevées que celles existant dans les vins, les chiffres trouvés sont dans l'ordre de grandeur de l'erreur de mesure et Na^+ ne paraît pas interférer sur la mesure spectrophotométrique de K^+ .

TABLEAU 5

Interférences dues au Na dans le dosage de K

Quantité de K en méq./l.	Quantité de Na ajouté en méq./l.	K apparent mesuré en méq./l.
1,00	0	1,00
1,00	2	1,00
1,00	3	1,00
1,00	5	1,00

B — Anions.

Phosphates. — L'addition de l'anion PO_4^{---} a été effectuée à partir d'une solution de $\text{PO}_4 \text{H}_3$ à 459 méq./l.

Le tableau N° 6 rend compte de l'interférence de cet anion dans le dosage du K.

PO_4^{---} provoque une action dépressive nette sur la mesure de K^+ mais dans les limites normales de teneur en PO_4 des vins, l'erreur introduite reste faible.

Les quantités croissantes de PO_4^{---} ajoutées ne laissent pas apparaître d'effet dépressif limite. Ce fait aurait pu être intéressant car en ajoutant à l'échantillon la quantité de PO_4 nécessaire pour atteindre la limite d'action dépressive, on aurait pu effectuer la correction de mesure correspondante.

TABLEAU 6

Interférences dues aux ions PO_4 dans le dosage du K

Quantité de K en méq./l	Quantité de PO_4 ajouté en méq./l	K apparent mesuré en méq./l	Erreur relative en p. 100
1,00	0	1,00	
1,00	0,17	1,00	
1,00	0,35	1,00	
1,00	0,50	0,98	— 2 p. 100
1,00	0,70	0,97	— 3 p. 100
Teneur en PO_4 normale des vins			
1,00	1,05	0,94	— 6 p. 100
1,00	1,25	0,96	— 4 p. 100
1,00	1,40	0,94	— 6 p. 100
1,00	2,50	0,92	— 8 p. 100
1,00	5,00	0,89	— 11 p. 100
1,00	10,00	0,88	— 12 p. 100
1,00	15,00	0,87	— 13 p. 100
1,00	25,00	0,84	— 14 p. 100
1,00	30,00	0,83	— 17 p. 100

Ces résultats ont servi à établir le graphique 3.

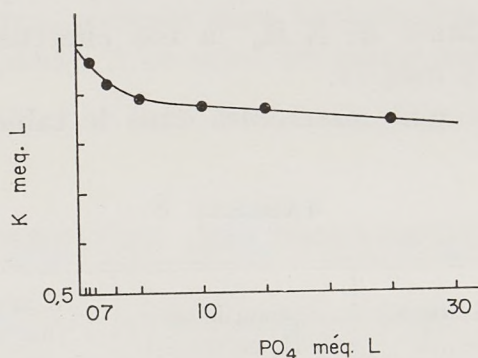


FIG. 3

Sulfates. — L'addition de SO_4^{--} a été effectuée à partir d'une solution de SO_4 H N/10 et les résultats sont donnés dans le tableau N° 7.

TABLEAU 7

Interférences dues aux sulfates dans le dosage du K

Quantité de K en méq./l.	Quantité de SO_4 ajouté en méq./l.	K apparent mesuré en méq./l.	Erreur relative en p. 100
1,00	— 0	1,00	
1,00	— 0,2	1,00	
1,00	— 0,25	0,98	— 2 p. 100
1,00	— 0,50	0,97	— 3 p. 100
1,00	— 0,75	0,94	— 6 p. 100
1,00	— 1,00	0,93	— 7 p. 100

Ces résultats ont servi à établir le graphique 4.

La présence de SO_4^{--} a donc une action dépressive sur la mesure de K^+ .

Cette erreur est peu importante pour des doses normales de SO_4^{--} dans les vins.

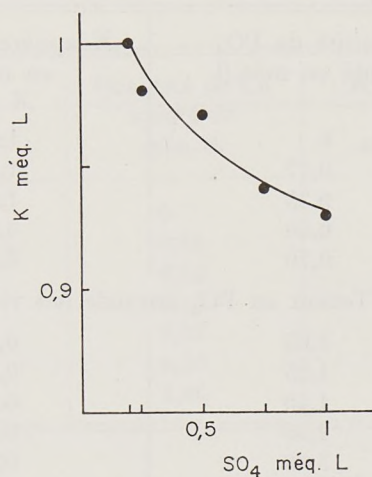


FIG. 4

C — Autres interférences.

La méthode spectrophotométrique de dosage de K peut également servir à doser ce cation dans les jus. La présence de doses importantes de N H_4^+ et de glucose nous a amené à considérer les interférences de ces composés.

Ammonium. — L'addition de N H_4^+ a été effectuée à l'aide d'une solution d'acétate d'ammonium à 5 méq./l.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau N°8.

TABLEAU 8

Quantité de K en méq./l.	Quantité de N H_4 en méq./l.	K apparent mesuré en méq./l.
1,00	0	1,00
1,00	0,06	1,00
1,00	0,12	1,00
1,00	0,25	0,99
1,00	0,50	1,00

TABLEAU 9

Interférence du glucose dans le dosage de K

Quantité de K en méq./l.	Quantité de glucose ajouté en gr./l.	K apparent mesuré en méq./l.
1,00	0	1,00
1,00	5	1,00
1,00	7	1,00
1,00	8	1,00
1,00	10	1,01

Les différences de pourcentage de transmission sont dans les limites des erreurs de lecture et $N H_4^+$ est sans action sur le dosage spectrophotométrique de K^+ , dans les limites des valeurs normales des moûts.

Glucose.

Le glucose ne paraît pas interférer d'une manière notable sur le dosage de K.

CONCLUSION

La méthode de dosage spectrophotométrique du potassium par simple dilution du vin paraît intéressante dans les conditions expérimentales étudiées.

La précision étant normalement de ± 3 p.100 et de ± 5 p.100 dans les cas les plus défavorables ; on pourrait, pour doser l'échantillon à analyser, l'encadrer entre deux étalons de concentration connue et faire une interpolation plutôt que de rapporter le chiffre de pourcentage de transmission lu sur le galvanomètre à une courbe d'étalonnage.

Cependant les mesures étant très constantes dans le temps, l'erreur qui provient de la lecture sur la courbe est négligeable.

On doit pouvoir, par contre, augmenter la précision du dosage en éliminant les sulfates et les phosphates, présents dans l'échantillon, sans enlever à ce mode de dosage sa qualité de rapidité. A ce sujet des essais sont en cours.

Reçu pour publication en mai 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONASTRE J., 1955. Étude comparative de quelques procédés de dosage du potassium dans les vins. *Ann. Fals. Fr.*, **48**, 347-351.
BONASTRE J., 1959. Contribution à l'étude des matières minérales dans les produits végétaux. *Ann. Technol. Agric.*, **8**, 377-396.
DORCHE J., ROLLET M., 1953. Dosage du sodium et potassium par spectrophotométrie de flamme. *Ex. du Lyon pharmaceutique*, n° 10, Oct., n° 11, Nov.
DORCHE J., ROLLET M., COSTET M^{lle} C., 1955. Application de la spectrophotométrie de flamme à l'analyse des médicaments. *Ann. Pharm. Fr.*, **13**, 283-287.
GUEGEN L., ROMBAUTS P., 1961. Dosage du sodium, du calcium et du magnésium par spectrophotométrie de flamme dans les aliments, le lait et les excréta. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 80-97.
MAVROIDINEANU R., BOITEUX H., 1954. L'analyse spectrale quantitative par la flamme. Masson.
-

ÉTUDE D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DU SODIUM DANS LES VINS ET LES MOUTS PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE DE FLAMME

C. JOURET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne.

SOMMAIRE

Le dosage du sodium dans les moûts et les vins par spectrophotométrie de flamme a été expérimenté à l'aide de l'appareil JOBIN et YVON, type «Algérie».

Les interférences possibles des éléments présents dans les moûts et les vins ont été étudiées.

Cette méthode de dosage, par simple dilution de l'échantillon avec ou sans surcharge, est rapide, simple et suffisamment précise (5 p. 100).

I. — INTRODUCTION

Le dosage du sodium par spectrophotométrie de flamme a fait l'objet de très nombreux travaux.

Les résultats varient sensiblement avec l'appareillage et le matériel biologique.

Pour les vins, le dosage du sodium étant intéressant dans certaines situations des vignobles (terrains salés, parcelles en bordure de mer) et devant servir à des analyses en série pour des essais statistiques, nous avons été amenés à mettre au point une technique de dosage spectrophotométrique avec l'appareil dont nous disposons.

II. — CARACTÉRISTIQUES DE L'APPAREIL

L'appareil utilisé est l'ensemble spectrophotomètre-dispositif de flamme construit par JOBIN et YVON.

L'alimentation de la flamme oxygène-acétylène se fait à une pression de fonctionnement de 1,100 Kg/cm² pour l'oxygène et 0,100 Kg/cm² pour l'acétylène.

Ces pressions se maintiennent à un niveau constant grâce à deux étages de détente.

La sensibilité maximum de 1 μ A du galvanomètre permet d'utiliser une fente suffisamment fine (4/100 mm de largeur et 8/10 mm de hauteur) pour obtenir une excellente sélectivité par le monochromateur de la raie d'émission d'étude de longueur d'onde 589 m μ .

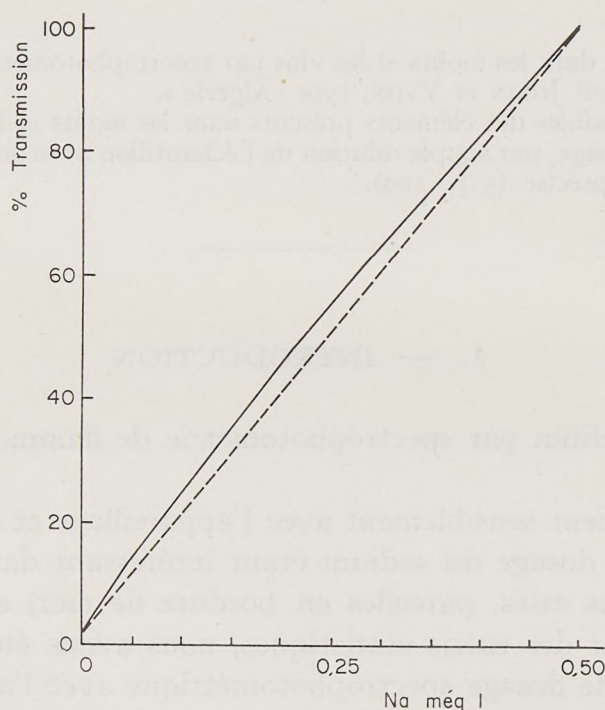
Avec ces caractéristiques de travail, le fond de flamme est de 2,5 divisions de l'échelle du galvanomètre.

III. — ÉTABLISSEMENT DE LA COURBE DE RÉFÉRENCE

Le 100 de l'échelle galvanométrique a été établi à partir d'une solution étalon de 0,5 méq. Na/l. Les solutions préparées soit à partir du Na Cl, soit de $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ donnent les mêmes résultats.

Solution en méq. Na/l	p. 100 transmission
0,50	100
0,45	91
0,40	82
0,35	73
0,30	64
0,25	55
0,20	45
0,15	35
0,10	25
0,05	14

Ces chiffres ont servi à tracer la courbe de référence.



Courbe de référence.

Les valeurs des pourcentages de transmission ne sont pas exactement proportionnelles aux quantités de sodium présentes dans les solutions. La droite obtenue présente une légère concavité du côté de l'axe des abscisses.

Pour obtenir un dosage plus précis, on peut encadrer l'échantillon à analyser entre deux étalons et faire une interpolation plutôt que de ramener le chiffre du pourcentage de transmission optique à la courbe de référence. On admet alors que les deux étalons sont reliés par un segment de droite ce qui est pratiquement exact pour deux étalons différents de 0,1 méq Na/l.

Cependant, les résultats obtenus ont été suffisamment constants et précis (les chiffres pour une solution de même concentration en Na variant de ± 1 division de l'échelle galvanométrique, ce qui correspond à une erreur de 0,01 méq. Na/l.) pour que l'on rapporte plus simplement à la courbe établie les pourcentages de transmission optique lus.

IV. — ESSAIS SUR VIN

Pour les essais sur vins, la dose de sodium normale dans ceux-ci, variant de 1 à 3 méq. Na/l., une dilution de 1/10 a été nécessaire pour rester dans les limites de la gamme de référence (la dilution a été de 1/25 pour certains vins provenant de vignobles de terrains salés contenant 11 méq. Na/l.).

Pour la recherche de la précision du dosage, nous avons utilisé la technique de la surcharge en ajoutant des doses connues de Na dans les échantillons de vins analysés.

Un certain nombre de résultats ont été rassemblés dans le tableau suivant.

Les doses de Na trouvées dans l'échantillon sont données en méq./l.

Échantillons	Vin dilué 10 fois	Vin dilué 10 fois + 0,10 méq. Na/l	Vin dilué 10 fois + 0,25 méq. Na/l	Vin dilué 10 fois + 0,35 méq. Na/l
1	0,01	0,12	0,28	0,37
2	0,03	0,15	0,30	0,41
3	0,03	0,15	0,30	0,41
4	0,04	0,16	0,34	0,44
5	0,05	0,16	0,31	0,42
6	0,09	0,20	0,37	0,49
7	0,14	0,26	0,42	0,51 (?)
8	0,15	0,25	0,41	0,52 (?)

Les doses de sodium trouvées sont toujours légèrement supérieures aux doses théoriques ; de 0,01 à 0,02 le plus souvent, l'erreur est au maximum de 0,04 pour un échantillon.

Cette erreur pouvant être due aux composés organiques des vins qui influeraient par excès, des mesures comparatives ont été faites sur des vins et leurs cendres.

*Comparaison vins et cendres**1^{er} essai :*

3 fractions de 10 ml d'un même échantillon de vin sont évaporés au bain-marie et calcinés à 525°C jusqu'à l'obtention de cendres blanches. Reprises par 1 ml d'HCL N/10 et diluées par H²O à 50 ml. 20 ml de chacune de ces dilutions reçoivent 1 ml et 3 ml d'une solution aqueuse à 5 méq. Na/l. (soit 0,10 à 0,30 méq./l. dans la prise d'essai) et sont diluées de nouveau jusqu'à 50 ml. La dilution est de 1/12,5.

Cendres

			Na méq./l. prise d'essai	Na méq./l. échantillon
1 ^{re} fraction	+ 1 ml 5 méq. Na/l		0,15	1,88
—	+ 3 ml —		0,35	4,13
2 ^e fraction	+ 1 ml —		0,15	1,88
—	+ 3 ml —		0,35	4,13
3 ^e fraction	+ 1 ml —		0,14	1,75
—	+ 3 ml —		0,35	4,13

Vins

3 fractions de 10 ml de vin, reçoivent 1 ml d'HCL N/10, sont diluées par H²O à 50 ml. 20 ml de chacune de ces dilutions reçoivent 1 ml et 3 ml d'une solution aqueuse à 5 méq. Na/l. et sont diluées jusqu'à 50 ml.

				Na méq./l prise d'essai	Na méq./l échantillon
				—	—
1 ^{re} fraction	+ 1 ml	5 méq. Na/l.		0,17	2,12
—	+ 3 ml	—		0,40	5,00
2 ^e fraction	+ 1 ml	—		0,17	2,12
—	+ 3 ml	—		0,40	5,00
3 ^e fraction	+ 1 ml	—		0,18	2,12
—	+ 3 ml	—		0,41	5,00

2^{me} Essai :

10 ml de l'échantillon sont additionnés de 5 gouttes d'HCL N/10 et dilués jusqu'à 50 ml par H²O.

3 fractions de 10 ml de cette solution servent aux mesures :

- l'une est diluée jusqu'à 20 ml par de l'eau distillée,
- les deux autres reçoivent respectivement 0,10 et 0,15 méq. Na/l. avant d'être portées à 20 ml.

Les cendres de 10 ml de l'échantillon reprises par 5 gouttes d'HCL N/10 subissent le même fractionnement.

Les résultats ont été groupés dans le tableau suivant :

Échantillons	Na méq./l					
	Vin			Cendres		
	1 ^{re} fraction	+ 0,1 méq. Na/l	+ 0,15 méq. Na/l	1 ^{re} fraction	+ 0,1 méq. Na/l	+ 0,15 méq. Na/l
1	0,12	0,22	0,27	0,03	0,14	0,20
2	0,29	0,42	0,47	0,24	0,35	0,40
3	0,30	0,42	0,46	0,30	0,40	0,45
4	0,06	0,18	0,23	0,07	0,16	0,22
5	0,06	0,18	0,23	0,06	0,15	0,20

Résultats

— Les chiffres trouvés sont souvent plus élevés dans le cas des vins : ceci peut provenir de pertes de Na durant la calcination et les manipulations qui résultent de l'obtention des cendres.

— L'action des matières organiques reste faible puisque lors des essais de surcharges les chiffres trouvés sont très comparables entre les vins et les cendres.

Il faut étudier l'interférence possible des matières minérales présentes à la fois dans le vin et ses cendres.

V. — INTERFÉRENCE DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX PRÉSENTS DANS LE VIN ET LE MOUT :

a) Cations :

Potassium — L'addition de K^+ dans une solution aqueuse de Na à 0,25 méq/l se fait à partir d'une solution de KCl à 30 méq. K/l.

				K/Na	Na méq./l trouvé
Solution Na 0,25 méq./l				—	—
—	—	+ 1,5	méq. K/l	6	0,25
—	—	+ 3,00	—	12	—
—	—	+ 4,50	—	18	—
—	—	+ 6,00	—	24	—
—	—	+ 8,00	—	32	—

Le potassium ne paraît pas avoir un rôle perturbateur dans le dosage du sodium avec les caractéristiques de travail utilisées.

Magnésium — L'addition d'ion Mg^{++} dans la solution de 0,40 méq Na/l se fait à partir d'une solution de $Mg Cl_2 \cdot 6 H_2 O$ à 44 mg./l.

				Mg/Na	Na en méq./l trouvé	Différence
Solution Na 0,40 méq./l				—	—	—
—	—	+ 0,88	méq. Mg/l	2,2	0,40	0
—	—	+ 1,76	—	4,4	0,41	+ 0,01
—	—	+ 2,64	—	6,6	0,41	+ 0,01
					0,40	0

L'erreur reste dans les limites de la précision du dosage.

Calcium — L'addition des ions Ca^{++} dans une solution à 0,50 méq. Na/l se fait à partir d'une solution de $Ca Cl_2$ à 152 méq/l.

				Ca/Na	Na méq./l trouvé
Solution NaCl 0,50 méq./l				—	—
—	—	+ 0,24	méq. Ca/l	0,50	0,50
—	—	+ 0,48	—	1,00	—
—	—	+ 0,72	—	1,50	—
—	—	+ 1,44	—	3,00	—
—	—	+ 2,16	—	4,00	—

La présence de Ca^{++} dans des proportions par rapport à Na^+ normales pour un vin ne paraît pas interférer sur la mesure spectrophotométrique du Na.

b) Anions :

Phosphates — Dans les vins normaux on trouve une dose minima de Na égale à 0,02 g/l tandis que PO_4 est au maximum de 0,8 g/l en P_2O_5 soit 0,18 g/l en P. Le rapport P/Na est donc au maximum égal à 9.

L'addition de P se fait à partir d'une solution de $\text{PO}_4 \text{H}_3$ de 1,8 g/l en P.

			P/Na	Na méq./l trouvé	Différence
Solution	0,40 Na méq./l		—	0,40	— 0,02
—	—	+ 0,64 méq./l de P	1,60	0,38	— 0,02
—	—	+ 1,24 —	3,10	0,375	— 0,025
—	—	+ 1,92 —	4,80	0,375	— 0,025
—	—	+ 2,48 —	6,20	0,37	— 0,03
—	—	+ 3,12 —	7,80	0,37	— 0,03
—	—	+ 3,76 —	9,40	0,36	— 0,04

La présence de P amène une interférence assez sensible sur le dosage de Na.

L'ordre de grandeur de cette interférence est de — 5 p. 100 pour $\text{P/Na} = 1,6$ à — 11 p. 100 pour $\text{P/Na} = 9,40$.

Sulfates — Dans les vins, on trouve au moins 0,02 g Na/l. La dose légale maxima de SO_4 est de 2 g/l en SO_2K_2 , soit 1,12 g de SO_4 /l.

Le rapport SO_4/Na sera au maximum égal dans les vins à 1,12/0,02, soit 56.

L'addition de SO_4 se fait à partir d'une solution de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}/10$.

			SO_4/Na	Na en méq./l trouvé	Différence
Solution	NaCl 0,40 méq./l		—	0,40	—
—	—	+ 0,40 méq. SO_4 /l	1	0,37	— 0,03
—	—	+ 4,00 —	10	0,37	— 0,03
—	—	+ 8,00 —	20	0,36	— 0,04
—	—	+ 12,00 —	30	0,36	— 0,04
—	—	+ 16,00 —	40	0,36	— 0,04
—	—	+ 20,00 —	50	0,35	— 0,05
—	—	+ 24,00 —	60	0,35	— 0,05

L'effet dépressif du SO_4 sur la mesure de Na est net. L'ordre de grandeur est de — 7 p. 100 pour $\text{SO}_4/\text{Na} = 1$ à — 12,50 p. 100 pour $\text{SO}_4/\text{Na} = 60$.

De nouveaux essais ont été effectués sur des solutions aqueuses de NaCl ayant reçu des additions à la fois d'anions sulfates et phosphates dans les mêmes rapports que les expériences précédentes pour se rendre compte d'un effet cumulatif possible.

Les résultats ont été rassemblés dans le tableau suivant :

		P/Na	SO_4/Na	Na en méq./l trouvé	Différence
Solution	témoin	—	—	0,40	—
—	N° 2	1,60	10,00	0,39	— 0,01
—	N° 3	3,10	20,00	0,38	— 0,02
—	N° 4	4,80	30,00	0,38	— 0,02
—	N° 5	6,20	40,00	0,39	— 0,01
—	N° 6	7,80	50,00	0,38	— 0,02
—	N° 7	9,40	60,00	0,39	— 0,01

Les effets dépressifs dus aux anions SO_4 et PO_4 précédemment mis en évidence ne s'additionnent pas et paraissent même se neutraliser puisque l'erreur par défaut introduite reste pratiquement constante et égale à — 0,02 méq /Na/l soit d'un ordre de grandeur de — 5 p. 100.

D'autre part, on peut penser que cet effet dépressif doit être également diminué dans les vins puisque dans les essais de surcharge (les rapports P/Na et SO_4/Na de l'échantillon diminuant) les doses de sodium ajoutées sont retrouvées d'une manière satisfaisante à $+ 0,02$ méq./l par suite d'une compensation de l'erreur par défaut faite sur la teneur du vin initial.

c) *Autres interférences :*

Dans les moûts on se trouve en présence d'ammonium et de glucose, qui disparaissent par calcination. Leur interférence possible a été testée.

Ammonium — L'addition de NH_4 est effectuée à partir d'une solution de NH_4Cl à 5 méq./l.

				NH_4/Na	Na en méq./l
				—	—
Solution NaCl 0,5 méq. Na/l				—	0,40
—	—	+ 0,25 méq. NH_4/l		0,5	—
—	—	+ 0,50	—	1,0	—
—	—	+ 1,00	—	2,0	—
—	—	+ 2,00	—	4,0	—
—	—	+ 2,50	—	5,0	—

Les pourcentages de transmissions trouvés sont dans la limite de l'erreur de lecture et NH_4^+ ne paraît pas interférer sur la mesure du Na.

Glucose — Les additions de glucose ont été faites dans des proportions correspondantes à des degrés alcooliques en puissance de 8, 10, 12 et 15°.

				Na méq./l
				—
Solution NaCl 0,20 méq Na/l				0,20
—	—	+ 140 g/l glucose		0,20
—	—	+ 170 g/l glucose		0,20
—	—	+ 200 g/l glucose		0,20
—	—	+ 260 g/l glucose		0,20

Le glucose ne produit pas d'interférence notable sur le dosage du sodium.

CONCLUSION

Le dosage spectrophotométrique du sodium dans les vins à l'aide de l'appareillage utilisé et dans les conditions d'emploi décrits est, à notre avis, simple, rapide et suffisamment précis (5 p. 100).

Pour avoir une mesure plus proche de la réalité on peut augmenter les teneurs en Na des échantillons par une surcharge de 0,01 à 0,3 méq.Na/l effectuée sur la dilution du vin analysé ; ceci diminue l'erreur par défaut due à la présence des ions PO_4 et SO_4 en réduisant les rapports P/Na et SO_4/Na .

On peut également penser à éliminer ces anions gênants à l'aide de résines échangeuses d'ions ; des essais, dans ce sens, sont en cours au laboratoire.

Reçu pour publication en mai 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DORCHE J., ROLLET M., 1953. Dosage du sodium et du potassium par spectrophotométrie de flamme. Lyon pharm. 259 et 291.
- DORCHE J., ROLLET M., COSTET M^{lle} C., 1955. Application de la spectrophotométrie de flamme à l'analyse des médicaments. *Ann. Pharm. Franc.*, **13**, 283-297.
- GUEGEN L., ROMBAUTS P., 1961. Dosage de Na ; K ; Ca et Mg par spectrophotométrie de flamme dans les aliments, le lait et les excréta —. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 80-97.
- MAVRODINEANU R., BOITEUX H., 1954. L'analyse spectrale quantitative par la flamme — Masson.
- WOLDRING M G., 1953. Flamme photometric determination of sodium and potassium in some biological fluids. *Anal. Chim. Acta.*, **8**, 150-167
-

NOTE SUR LES TENEURS EN POTASSIUM, SODIUM ET CHLORE DES VIGNES DES TERRAINS SALÉS

C. JOURET et C. POUX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne.

SOMMAIRE

Au cours de deux années (1958 et 1960) on a déterminé les teneurs en Na et Cl des moûts et des vins correspondants provenant de vignes présentant des symptômes pathologiques de l'effet du sel et de vignes saines.

Les teneurs en Na et Cl des moûts et vins provenant des ceps malades sont beaucoup plus élevées que les teneurs des moûts et vins provenant de ceps sains. La teneur en ions Cl est dans tous les cas plus élevée que la teneur en ions Na⁺.

INTRODUCTION

BONJEAN (1898), ROOS et col. (1900) et BREMOND (1937) ont constaté un enrichissement parfois considérable des teneurs en Cl et Na dans les vins provenant de vignobles du littoral ou complantés sur des terrains salés.

Certaines parcelles du domaine expérimental de la Station de Narbonne (Domaine de Pech Rouge), possèdent, par îlots, des groupes de ceps présentant les signes caractéristiques de l'excès de salure du sol : feuilles se desséchant sur le pourtour, en particulier à la véraison ; rameaux partiellement dépouillés de leurs feuilles.

Une analyse de chlorure effectuée dans ces sols n'a révélé cependant au printemps qu'une teneur de 0,16 à 0,4 p. 1 000.

Nous avons comparé pendant 2 années (1958 et 1960) la composition des moûts et des vins, issus, d'une part, de raisins provenant de ceps présentant les caractères pathologiques d'excès de Na Cl, d'autre part, de raisins provenant de ceps voisins, de la même parcelle, mais ne présentant aucun symptôme pathologique de salure.

Nous avons aussi comparé dans certains cas à la composition de moûts et vins provenant de vignes normales complantées en sol exempt de Na Cl.

MÉTHODES ANALYTIQUES

En plus des éléments analytiques courants portant sur les moûts et les vins, nous avons dosé Cl, Na et K.

Le Chlore a été dosé par la méthode CHARPENTIER-VOLHARD (JAULMES 1951) ; le potassium et le sodium par des techniques de spectrophotométrie de flamme mises au point dans notre laboratoire.

ESSAIS

ESSAIS 1958 :

On a prélevé par grappes entières 22,700 kg de raisins sur des ceps ne présentant aucun signe pathologique de salure et d'autre part, 16,400 kg sur des ceps présentant les signes pathologiques d'excès de sel.

On a effectué un essai de fermentation, vinification en rouge vendange entière, sur chacun de ces lots portant sur 15 kg pour le lot témoin et 14,700 kg pour le lot dit « salé ».

Les caractéristiques du moût sont les suivantes :

	Degré réfractométrique	Acidité totale
Témoin.....	11°70	4,60
Salé.....	9°80	6,50

On peut donc constater qu'en 1958 les raisins de souches malades n'étaient pas arrivés au même stade de maturité que les témoins (acidité plus élevée et richesse en sucre plus faible).

Les caractéristiques du vin reflètent ce manque de maturité.

	Degré	A. T.	A. V.
Témoin	11°60	4,40	0,18
Salé	9°20	4,90	0,18

Remarque. — Le degré probable donné par réfractométrie se trouve exact pour les vins des souches saines, il est supérieur à celui du vin fait pour les vins des souches malades.

TABLEAU I

Moûts et Vins des essais de 1958 (analysés en 2-61)

	Moût		Vin	
	Témoin	Salé	Témoin	Salé
Degré	11°60	9°80	11°50	9°20
Acidité Totale	3,90	5,10	2,90	3,70
pH	—	—	3,80	2,90
K	46,50	49,00	44,00	50,50
Na	1,30	5,40	1,50	7,50
K/Na	35,80	9,00	29,40	6,70
Cl	9,60	53,20	11,00	54,60
Cl/Na	7,30	9,80	7,60	7,30
So ₄	—	—	3,30	4,10
Alcalinité cendres	—	—	35,00	19,60
Fermentation malolactique			+	—

(Le degré est le degré alcoolique ou en puissance. Les autres résultats sont en méq. par litre.)

Un échantillon de moût de chaque lot a été conservé par pasteurisation et a été analysé avec les moûts et les vins des essais de 1960. Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 1.

Remarque. — L'acidité totale du moût ayant diminué par rapport à l'analyse faite sur le jus frais en 1958, on peut en déduire une précipitation de bitartrate. Ceci entraîne aussi pour le potassium des chiffres inférieurs à la réalité.

Toutefois, les teneurs en Na et en Cl font apparaître des différences très nettes entre les liquides issus de pieds à symptômes de salure par rapport à ceux qui sont issus de ceps sains.

ESSAIS 1960

Ces essais ont porté sur les mêmes parcelles et pratiquement sur les mêmes pieds. Le lot témoin était constitué par 55,700 kg de grappes et le lot de souches atteintes par le sel par 53,600 kg de vendange.

1^o Moûts

Pressé dans les mêmes conditions le lot témoin a donné 35 litres de jus et le lot salé 29,50 litres ; les rendements en jus sont de 62,80 litres aux 100 kg de raisins pour le témoin et de 55 litres aux 100 kg pour le salé.

Contrairement aux observations de 1958, en 1960 les grains des souches atteintes sont ridés (sans être franchement passerillés) et moins aqueux.

Ils présentent une concentration sur pied assez nette et pas de retard à la maturation comme en 1958, tel qu'il ressort des analyses des moûts données au tableau n^o 2.

TABLEAU 2

	Vendange 1960							
	D ^o (1)	Acidité totale	pH	K	Na	K/Na	Cl	Cl/Na
Témoin.....	12 ^o 7	4,10	3,40	47,50	1,80	26,30	5,20	2,90
Parcelle salée.....	14 ^o 0	5,00	3,00	51,00	7,00	7,30	32,40	4,60

La concentration qui a pu avoir lieu sur pied, calculée soit à partir du rendement soit à partir des sucres (degré probable), soit à partir du potassium est de l'ordre de 8 à 10 p. 100, entre les lots salés par rapport aux lots témoins. La teneur en sodium ou en chlore des parcelles salées est beaucoup trop élevée pour être expliquée par cette concentration sur pied et rend plutôt compte de l'absorption par la plante des ions Na et Cl. Ces ions ne sont d'ailleurs pas absorbés également par la plante qui voit les ions Cl l'emporter nettement sur les ions Na.

2^o Vins

A partir du lot témoin (55,700 kg), et du lot salé (53,600 kg), on a effectué pour chaque lot une vinification en rosé et en rouge.

Après homogénéisation de chaque jus recueilli et des gâteaux de pressurage comprenant les rafles, les pellicules et les pépins, on a réparti proportionnellement les parties solides des raisins au volume du moût mis en œuvre.

(1) Degré probable par réfractométrie.

Cependant, pour l'essai en rouge des ceps salés, on a effectué un essai avec une quantité de matières solides plus riche que la normale, soit 1 kg de matières solides (rafles, pellicules et pépins) pour 1 litre de moût au lieu de 0,666 kg de matières solides pour 1 litre de jus, proportion correspondant au rapport réel existant sur le lot de vendange considérée, cet essai devant permettre de se rendre compte de l'apport particulier des matières solides.

Les résultats des analyses de ces différents vins obtenus à partir de deux lots de vendanges, décrit ci-dessus sont rassemblés dans le tableau n° 3.

TABLEAU 3
Vins 1960

Échantillons Vins	D° (¹)	Acidité totale	pH	K	Na	K/Na	Cl	Cl/Na	Alcal. des cendres	F. M. (²)
Témoin rosé.....	13°10	3,60	3,50	25,0	1,60	16,70	5,40	3,40	24,50	+
Témoin rouge.....	12°70	3,04	3,75	37,0	2,80	13,20	10,80	3,90	34,05	+
Salé rosé.....	14°10	5,49	3,00	33,0	6,80	4,70	32,00	4,70	19,85	—
Salé rouge.....	13°90	5,00	3,10	46,50	10,00	4,70	46,80	4,70	21,10	—
(matières solides normales)										
Salé rouge.....	13°10	3,90	3,35	58,50	11,50	4,90	60,0	5,10	23,80	+
(matières solides surchargées)										

(¹) Degré alcoolique.
(²) F.M. = fermentation malolactique par chromatographie.

Les essais de 1960 confirment ceux de 1958 quant à la plus grande richesse en ions Na⁺ et Cl⁻ dans les parcelles à caractères pathologiques de salure. Toutefois, en raison de la proximité de la mer, de l'influence des embruns ou des apports mécaniques par le vent, un essai de lavage de grappes a été effectué pour déterminer l'influence d'un apport exogène possible.

INFLUENCE D'UN APPORT EXOGENE

Un échantillonnage de 100 grains a été effectué sur 3 lots :
Un lot prélevé sur :
— les souches des terrains salés présentant des signes d'excès de salure ;

Résultats

		K még./l.	Na még./l.	K/Na
Souches de terrain salé..	{ grains non lavés	52,5	10	5,3
	{ grains lavés et séchés	60,0	10	6,0
Souches témoins.....	{ grains non lavés	34,0	1,2	28,3
	{ grains lavés et séchés	34,0	1,1	31,0
Souches proches de la mer	{ grains non lavés	45,0	1,3	34,0
	{ grains lavés et séchés	44,0	1,3	3,38

— les souches témoins d'une parcelle non salée ;

— les souches d'une parcelle proche de la mer ;

Ces 100 grains ont été répartis en deux fractions :

— l'une étant pressurée telle quelle pour la mesure ;

— l'autre étant préalablement lavée à l'eau courante et séchée à l'air libre.

Les moûts des souches des terrains salés présentent un enrichissement considérable en Na et également un enrichissement net en K comparativement aux vignes témoins.

Les souches des terrains proches de la mer ne présentent pas d'enrichissement.

L'action mécanique du vent ou des embruns paraît être nulle.

CONCLUSION

— Les teneurs en Na^+ et en Cl^- des moûts provenant de vignes de terrains salés et présentant les symptômes de l'effet pathologique du sel sont nettement plus importantes que les teneurs des moûts provenant de ceps des mêmes vignes ne présentant pas ces symptômes.

Pour l'ion Na en 1958 la teneur est 4,1 fois plus élevée et en 1960 3,88. Pour l'ion Cl les teneurs sont 5,5 fois plus élevées en 1958 et 6,2 fois plus en 1960.

— Ces ions étant particulièrement solubles les doses enregistrées pour les moûts se retrouvent dans les vins issus de ces moûts. (cas des vins rosés).

De plus, comme pour l'ensemble des matières minérales on constate un enrichissement des vins en ces éléments, avec la macération des matières solides de la vendange (cas des vins rouges, avec taux normal et plus élevé de matières solides).

— Un enrichissement par action mécanique (embruns, poussières) n'est pas apparent dans le cas étudié.

— Les teneurs en potassium sont également plus élevées, le sodium ne remplaçant pas le potassium, celui-ci, au contraire semble être plus absorbé par la plante ce qui a pour effet de contre balancer l'introduction massive de l'ion Cl.

Le rapport K/Na est beaucoup plus faible dans les vignes de terrains salés, variant de 3 à 7 au maximum ; tandis que ce même rapport est toujours supérieur à 13 et va jusqu'à 45,0 pour les vignes témoins.

— Les teneurs en chlorures sont très fortes, voisines de 50 méq. l. de Cl. La dose limite généralement admise de 1 g. l. de chlorure en Cl Na soit 17 méq. l. de Cl environ est largement dépassée.

Cette absorption massive confirme les constatations qui montrent que Cl est plus facilement absorbé que Na (DEMOLON, 1950). Le rapport Cl/Na est d'ailleurs supérieur à 1, variant dans nos analyses de 1,7 à 7,6. D'une manière générale, ce rapport est plus élevé pour les vignes poussant sur terrain salé que pour les vignes témoins.

Notons que s'il est confirmé que le Cl est plus facilement absorbé par la plante et en plus grande quantité que le Na ; dans le cas où un vin présente une forte teneur de Na et une teneur normale en Cl, on peut suspecter une introduction d'ions Na.

Pour confirmer cette hypothèse une étude statistique reste toutefois à faire.

— L'alcalinité des cendres est plus faible pour les vins de terrains salés malgré des teneurs en cations plus élevées ; cela est en relation avec les teneurs importantes en Cl de ces vins.

Reçu pour publication en mai 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONJEAN E., 1898. Sur la présence naturelle de grandes proportions de chlorures de potassium et de sodium dans le jus de raisin et dans les vins des régions salées de l'ORANIE. *Rev. Vit.*, **9**, 583.
- BREMOND E., 1937. Contribution à l'étude analytique et physico-chimique de l'acidité des vins. Thèse Doctorat.
- DEMOLON A., 1950. Croissance des végétaux cultivés *Dun d.*
- JAULMES P., 1951. Analyses des vins — *Poulain*.
- JOURET Cl. Étude d'une technique de dosage du sodium dans les vins et les moûts, par spectrophotométrie de flamme (à paraître).
- JOURET Cl., POUX Ch. Étude d'une technique de dosage du potassium dans les vins et les moûts. (à paraître).
- ROOS, ROUSSEAU, DUGAST, 1900. Les vins des terrains salés de l'ALGÉRIE. *Rev. Vit.*, **13**, 647-655.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1961

H. BIOL, C. FOULONNEAU. — Le paeonidol 3.5 diglucoside dans le genre <i>Vitis</i>	345
H. BIOL, A. MICHEL. — Chromatographie sur papier des matières colorantes des vins rouges	319
H. BIOL, A. MICHEL. — Techniques chromatographiques appliquées à la différenciation des matières colorantes des vins rouges.....	325
H. BIOL, A. MICHEL. — Étude chromatographique des vins rouges issus de cépages réglementés	339
A. BOURDET. — Phénomènes amylolytiques en technologie boulangère. II. Appréciation pratique de l'activité alpha-amylasique des farines de Blé	301
J. CARLES, M. LAMAZOU-BETBEDER, R. PECH. — État actuel de nos connaissances sur quelques actions bactériennes dans les vins	61
J. CAUSERET, D. HUGOT, C. GOULAS-SCHOLLER, G. MOCQUOT. — Évolution de la teneur du lait stérilisé en riboflavine et en vitamine A au cours d'une conservation de longue durée.....	289
C. JOURET. — Étude d'une technique de dosage du sodium dans les vins et les moûts par spectrophotométrie de flamme	361
C. JOURET, C. POUX. — Étude d'une technique de dosage du potassium par spectrophotométrie de flamme dans les vins et les moûts.....	351
C. JOURET, C. POUX. — Note sur les teneurs en potassium, sodium et chlore des vignes des terrains salés	369
S. KUZDZAL-SAVOIE, W. KUZDZAL. — Les acides polyinsaturés du beurre	73
S. LAFON-LAFOURCADE, E. PEYNAUD. — Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification	143
J. LECLERCQ. — La force boulangère des blés et son appréciation au cours de la sélection.....	157
G. MARTEAU, J. SCHEUR, C. OLIVIERI. — Cinétique de la libération enzymatique du méthanol au cours des transformations pectolytiques du raisin.....	161
H. de ROBICHON-SZULMAJSTER. — Contribution à l'étude génétique et physiologique du métabolisme du galactose chez la levure. 1 ^e partie.....	81
2 ^e partie.....	185
E. PEYNAUD, S. DOMERCQ. — Études sur les bactéries lactiques des vins....	43
N. M. SHEIKH, B. GODON, L. PETIT. — Influence des produits de la réaction de Maillard sur la fermentation alcoolique et le développement de la levure.	5

TABLIÉ DES MATIÈRES DE L'ANNEE 1961

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. -- 19-12-1961

Dépôt légal : 4^e trim. 1961.

N^o d'imp. : 138